



UBA BICENTENARIO
18102010
DE LA REVOLUCIÓN DE MAYO



Facultad de Ciencias
VETERINARIAS
Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS
INMUNOLOGÍA

**Lipoarabinomananos de micobacterias:
efecto sobre la respuesta inmune en
bovinos**

Autor

Lic. Silvia Colavecchia

Director

Dra. Silvia Mundo

Tesis doctoral

2010



AGRADECIMIENTOS

A Silvia Mundo porque confió en mí y me acompañó en todo momento.

A Eloy por su gran colaboración en los experimentos a campo, incondicional con lluvia, nieve o frío.

A mis amigos de Inmuno, Ana, Ana, Bárbara, Laura, Laura y Lucas por todas las horas que me prestaron para que pudiera terminar la tesis.

A Ana Jar por sus correcciones y apoyo durante todo este tiempo de escritura.

A los integrantes de Inmunología, Vivi, Ali, Susi y Nico por su colaboración en todo momento.

A Javier Mas por los análisis de laboratorio.

A Adriana Fontanals por su colaboración en los experimentos de citometría de flujo.

A la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UBA por facilitarme los medios e instalaciones para mi trabajo de tesis.

A Marina, por lo mates y charlas de todas las mañanas.

A Ale, Mariell, Charly, Carlos y Diego por tantos años de amistad.

A mi familia por ayudarme a crecer en la vida y en la profesión.

A Gaby, por brindarme su amor, paciencia y comprensión.

A Agus y Guille porque son quienes me motivan cada día a seguir adelante.

ÍNDICE



ÍNDICE DE SECCIONES

	Nº DE PÁGINA
ABREVIATURAS	1
RESUMEN	5
ABSTRACT	8

INTRODUCCIÓN

1. BREVE REVISIÓN DE LA INMUNOLOGÍA.....	11
1.1. Historia de la Inmunología.....	11
1.2. Teorías sobre la Inmunidad.....	13
2. VISIÓN ACTUAL DEL SISTEMA INMUNE.....	15
2.1. Respuesta inmune innata.....	15
2.2. Respuesta inmune adaptativa.....	22
2.2.1. Respuesta inmune humoral.....	25
2.2.2. Respuesta inmune celular.....	29

2.2.3.	Perfiles de linfocitos y anticuerpos.....	32
2.2.4.	Regulación de la respuesta inmune.....	32
2.2.5.	Memoria inmunológica.....	34
3.	VACUNAS Y ADYUVANTES.....	35
3.1.	Mecanismos de acción de los adyuvantes.....	36
3.1.1.	Generación de depósitos.....	37
3.1.2.	Presentación antigénica.....	37
3.1.3.	Distribución del antígeno.....	37
3.1.4.	Inducción de respuestas citotóxicas producidas por LTc.....	38
3.1.5.	Producción de citoquinas.....	38
3.2.	Actualidad en el estudio de los adyuvantes	39
4.	MICOBACTERIAS Y COMPONENTES DE LA PARED CELULAR.....	44

4.1. Estructura de LAM y lipoglicanos relacionados de micobacterias	46
4.2. Utilización de micobacterias y LAM como moduladores de la respuesta inmune.....	48
5. ¿POR QUÉ ELEGIR LA ESPECIE BOVINA?.....	50

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

6. HIPOTESIS.....	51
7. OBJETIVOS.....	52
7.1. Objetivo general.....	52
7.2. Objetivos particulares.....	52

MATERIALES Y MÉTODOS

8. CULTIVO DE MICOBACTERIAS.....	53
9. EXTRACCIÓN DE LAM.....	54
10. IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL EXTRACTO CRUDO	56

10.1. Determinación de azúcares por el método de Fenol-Sulfúrico.....	56
10.2. Determinación de proteínas por el método de Bradford.....	56
10.3. Control por electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE).....	56
10.4. Tinción de hidratos de carbono.....	57
10.5. Tinción de proteínas.....	57
11. CARACTERIZACIÓN ANTIGÉNICA DEL EXTRACTO CRUDO.....	58
11.1. Evaluación de la antigenicidad del extracto crudo por ELISA	58
11.2. Evaluación de la antigenicidad del extracto crudo por Western-blot.....	59
12. PURIFICACIÓN DE LAM A PARTIR DEL EXTRACTO CRUDO.....	60
12.1 Evaluación de la antigenicidad las fracciones obtenidas por ELISA.....	60

13.	DISEÑO EXPERIMENTAL.....	61
14.	TOMA DE MUESTRAS.....	63
15.	EVALUACIÓN GENERAL DE LOS ANIMALES E INOCUIDAD DEL TRATAMIENTO.....	64
15.1.	Valores hematológicos.....	64
15.2.	Perfil de proteínas séricas.....	64
15.3.	Niveles de anticuerpos específicos a la vacunación anti-aftosa.....	64
15.4.	Niveles de anticuerpos frente a <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> (Map) ELISA-PPA.....	65
15.5.	Cultivo de Map.....	65
15.6.	Control de leucosis bovina.....	66
15.7.	Control de la ganancia de peso.....	66
16.	EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE INTERMEDIARIOS REACTIVOS DEL OXÍGENO.....	67
17.	EVALUACIÓN DE LA INMUNIDAD CELULAR.....	68

17.1.	Linfoproliferación.....	68
17.2.	Determinación de la producción de IFN γ en sobrenadantes de cultivo.....	69
17.3.	Determinación de subpoblaciones linfocitarias <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	69
17.3.1.	<i>In vivo</i>	69
17.3.2.	<i>In vitro</i>	72
17.4.	Prueba de hipersensibilidad cutánea específica...	72
18.	EVALUACIÓN DE LA INMUNIDAD HUMORAL.....	74
18.1.	Titulación de anticuerpos específicos frente OVA	74
18.2.	Determinación de isotipos específicos frente a OVA.....	74
19.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	75

RESULTADOS

20.	EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LAM.....	76
-----	------------------------------------------	----

20.1.	Obtención del extracto crudo de LAM de Maa.....	76
20.2.	Identificación y caracterización del extracto crudo.....	76
20.3.	Purificación de LAM de Maa.....	78
20.4.	Caracterización antigénica del LAM purificado.....	80
21.	EVALUACIÓN GENERAL DE LOS ANIMALES E INOCUIDAD DEL TRATAMIENTO.....	85
21.1.	Evaluación de valores hematológicos.....	85
21.2.	Perfil de proteínas séricas.....	87
21.3.	Control de la producción de anticuerpos anti- aftosa inducidos por vacunación.....	90
21.4.	Evaluación de anticuerpos frente a Map, cultivo de materia fecal y anticuerpos frente a virus de leucosis bovina.....	92
21.5.	Efecto sobre el crecimiento corporal.....	93
22.	EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE INTERMEDIARIOS REACTIVOS DEL OXÍGENO.....	94

23.	EVALUACION DE LA RESPUESTA INMUNE CELULAR.....	95
23.1.	Efectos en la proliferación de CMN.....	95
23.2.	Efecto sobre la producción de IFN γ	99
23.3.	Efecto sobre las subpoblaciones linfocitarias periféricas.....	100
23.4.	Subpoblaciones celulares estimuladas <i>in vitro</i>	104
23.5.	Hipersensibilidad cutánea específica.....	108
24.	EVALUACIÓN DE LA INMUNIDAD HUMORAL.....	109
24.1.	Cinética de anticuerpos específicos frente a OVA	109
24.2.	Identificación de isotipos específicos frente a OVA.....	111
25.	DISCUSION	113
26.	CONCLUSIONES	125
27.	BIBLIOGRAFÍA	127

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

TABLAS

	Nº DE PÁGINA
Tabla 1: Principales componentes celulares y humorales de la RII.....	17
Tabla 2: Isotipos de Acs identificados en bovinos.....	27
Tabla 3: Adyuvantes y su modo de acción.....	40
Tabla 4: Adyuvantes utilizados en humanos.....	43
Tabla 5: Anticuerpos utilizados para la determinación de subpoblaciones por citometría de flujo.....	70
Tabla 6: Anticuerpos utilizados para el reconocimiento de los diferentes isotipos bovinos.....	75
Tabla 7: Rendimiento de la extracción de LAM.....	76
Tabla 8: Caracterización de las fracciones obtenidas de la extracción y purificación de LAM	81
Tabla 9: Rendimiento de la extracción y purificación de LAM.....	82

Tabla 10: Valores hematológicos y fórmula leucocitaria absoluta obtenidos a partir de suero de los bovinos utilizados a tiempo 0 (t0) y a tiempo final (tf).....	86
Tabla 11: Proteinograma obtenido de los bovinos a tf.....	88
Tabla 12: Anticuerpos específicos frente a PPA determinados por ELISA	92
Tabla 13: Ganancia de peso de los terneros.....	93
Tabla 14: Respuesta proliferativa frente a mitógenos y antígenos específicos de los diferentes grupos de animales a tf utilizando CMN.....	98
Tabla 15: Subpoblaciones linfocitarias.....	105
Tabla 16: Relación CD4/CD8 obtenida a tf.....	107
Tabla 17: Incremento en el grosor de piel 72 h post-inoculación intradérmica.....	108

FIGURAS

Figura 1: Inducción de la RIA y mecanismos efectores.....	24
Figura 2: Estructura de un anticuerpo	26
Figura 3: Linfocitos TCD4 ⁺ y sus funciones efectoras.....	31
Figura 4: Esquema de la pared celular de las micobacterias.....	45
Figura 5: Modelo estructural de LAM de <i>M. tuberculosis</i>	47
Figura 6: Cultivo de Maa.....	53
Figura 7: Esquema de extracción de LAM.....	55
Figura 8: Esquema de inmunización.....	62
Figura 9: Terneros inmunizados (durante el período de experimentación).....	62
Figura 10: Toma de muestras.....	63
Figura 11: Determinación de los parámetros a evaluar por citometría de flujo.....	71

Figura 12: Intradermorreacción de un bovino del grupo G-OVALAM.....	73
Figura 13: SDS-PAGE del extracto crudo.....	77
Figura 14: Western blot del extracto crudo.....	78
Figura 15: Estimación de hidratos de carbono en cada una de las fracciones obtenidas luego de la purificación por columna de exclusión molecular.....	79
Figura 16: Caracterización antigénica del LAM purificado utilizando un anti-LAM de Mtb.....	80
Figura 17: Antigenicidad de cada una de las fracciones obtenidas.....	83
Figura 18: Fracciones obtenidas de la extracción y purificación de LAM evaluadas por SDS-PAGE al 12% revelado por tinción argéntica modificada.....	84
Figura 19: Electroforesis sérica de un bovino perteneciente al grupo G-OVALAM a t0 y tf.....	89
Figura 20: Título de anticuerpos específicos frente a VFA.....	91
Figura 21: Niveles de estallido respiratorio de células periféricas adherentes.....	94

Figura 22: Efecto de LAM en la respuesta linfoproliferativa de CMN estimuladas con ConA.....	96
Figura 23: Efecto de LAM en la respuesta linfoproliferativa de CMN estimuladas con OVA y LAM.....	97
Figura 24: Detección de IFN γ en el sobrenadante de cultivo.....	99
Figura 25: Subpoblaciones linfocitarias periféricas evaluadas a t_f de un bovino representativo de cada grupo de tratamiento.....	102
Figura 26: Efecto de LAM sobre la subpoblación CD25 ⁺ <i>in vivo</i>	103
Figura 27: Cinética de anticuerpos específicos frente a OVA evaluados por ELISA.....	110
Figura 28: Isotipificación de los anticuerpos específicos frente a OVA por ELISA.....	111

ABREVIATURAS



ABREVIATURAS

Ac	anticuerpo
AcMo	anticuerpo monoclonal
ADCC	citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos
AFC	adyuvante de Freund completo
AFI	adyuvante de Freund incompleto
ANOVA	análisis de varianza
ara ^f	arabinofuranosas
BCG	Bacilo Calmette-Guérin
BCR	receptor de células B
CD	células dendríticas
CD4	grupo de diferenciación 4
CD8	grupo de diferenciación 8
CD25	grupo de diferenciación 25
cm	centímetro
CMN	células mononucleares
Con A	concanavalina A
CPA	células presentadoras del antígeno
CpG	islas de citocina-guanosina
cpm	cuentas por minuto
DAB	diamino bencidina
DMSO	dimetil sulfóxido
DO	densidad óptica
DS	desvío estándar
EDTA	etilendiaminotetraacético
ELISA	prueba de inmunoadsorción ligada a enzima
Fab	fragmento de unión al antígeno

Fc	fragmento cristalizable
FcRn	receptor de IgG neonatal
FITC	fluoresceína
GL	glicolípidos
h	horas
HCL	ácido clorhídrico
H ₂ O ₂	peróxido de hidrógeno
H ₂ SO ₄	ácido sulfúrico
IDR	intradermorreacción
IE	índice de estimulación
IFN	interferón
Ig	inmunoglobulinas
IL	interleuquina
ISCOMS	complejos inmunoestimulantes
kDa	kilodalton
kg	kilogramo
KOH	hidróxido de potasio
LAM	lipoarabinomanano
LB	linfocito B
LM	lipomanano
LPS	lipopolisacárido
LT	linfocito T
LTc	linfocito T citotóxico
LTr	linfocitos T reguladores
m	metro
M	molar
Maa	<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>avium</i>
Maai	<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>avium</i> inactivada por calor
Man _p	manopiranosas

Map	<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>
MHC	moléculas de histocompatibilidad
Min	minutos
μg	microgramos
μL	microlitros
mg	miligramos
mL	mililitros
mm	milímetros
Mtb	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
N	normal
NBT	azul de tetrazolio
NK	natural killer
NKT	natural killer T
nm	nanometros
OPD	dihidrocloreuro de <i>o</i> -fenilendiamina
OVA	ovalbúmina
PAMPs	patrones moleculares conservados asociados a patógenos
PBS	buffer fosfato salino
PBST	PBS conteniendo 0,05 % tween 20
PBST-leche	PBST y 5% de leche descremada
PCR	proteína C reactiva
PFA	proteínas de fase aguda
pg	picogramos
PIM	fosfo- <i>myo</i> inositol manósido
PM	peso molecular
PPA	derivado proteico purificado de Maa
PPDb	derivado proteico purificado de <i>M. bovis</i>
RII	respuesta inmune innata
RFc	receptor para Fc

rpm	revoluciones por minuto
SDS	dodecilsulfato de sodio
SDS-PAGE	geles de poliacrilamida con SDS
TA	temperatura ambiente
TBS	buffer tris salino
TCR	receptor de células T
TGF- β	factor de crecimiento transformante beta
Th	T "helper"
TLR	receptores tipo "toll"
TNF	factor de necrosis tumoral
UI	unidades internacionales
V	voltios
VC	valor de corte
VFA	virus de fiebre aftosa
VH	dominio variable de las inmunoglobulinas
vol	volumen
X	promedio

RESUMEN



RESUMEN

La vacunación es el método más efectivo para controlar una infección. Las vacunas efectivas inducen una respuesta inmune protectora, activando linfocitos T y B, que convertidos en células de memoria controlan infecciones producidas por el patógeno incluido en la formulación de la vacuna. Las vacunas elaboradas con virus o bacterias inactivados o a subunidades tienen la capacidad de generar una respuesta inmune específica eficiente, pero a veces débil ya que no se multiplican en el huésped. Es por eso, que requieren el uso de adyuvantes que potencien la respuesta inmune. La selección de un adyuvante apropiado no solamente permite aumentar la respuesta inmune sino que también permite modular el isotipo de inmunoglobulina que se produce y también el tipo de perfil, Th1 o Th2.

El Lipoarabinomano (LAM) se encuentra unido de forma no covalente a la membrana plasmática de las micobacterias y se extiende hasta el exterior de la pared celular. Esta molécula juega un papel muy importante en la fisiología de las bacterias así como también en la modulación de la respuesta inmune del huésped durante la infección. Numerosos grupos de investigadores describen los efectos adyuvantes y moduladores de las micobacterias induciendo la respuesta hacia un perfil Th1 cuando se agregan a vacunas.

El objetivo de este trabajo de tesis fue evaluar el efecto de la aplicación de ovalbúmina (OVA) junto con LAM y adyuvante de Freund incompleto (AFI) en la respuesta inmune celular y humoral de bovinos específica a OVA.

Se extrajo y purificó LAM de *Mycobacterium avium* subsp. *avium* utilizando una extracción química publicada previamente por Hamasur et al. (1999), y se obtuvo un rendimiento similar al obtenido por dichos autores.

Mediante el uso del anticuerpo monoclonal que reconoce específicamente LAM de *Mycobacterium tuberculosis* se confirmó que la estructura del LAM obtenido a partir de cultivos de *Mycobacterium avium* subsp. *avium* conserva un alto grado de similitud antigénica con el de *Mycobacterium tuberculosis*.

Se utilizaron 22 terneros mestizos de entre 10 y 12 meses de edad los cuales fueron asignados al azar a 4 grupos de tratamiento, **G-AFI**, inmunizados con PBS y 1 mL de AFI, **G-LAM**, inmunizados con LAM 1 mg/dosis y AFI, **G-OVA**, inmunizados con OVA (1 mg/dosis) y AFI, y **G-OVALAM**, inmunizados con OVA, AFI y LAM. Se inmunizaron en forma subcutánea a los días 0, 21 y 42. Dado que una de las limitantes más importantes del uso de adyuvantes es el posible efecto tóxico directo o indirecto sobre los productos derivados al consumo humano se evaluaron una serie de parámetros fisiológicos a fin de controlar la formulación del inmunógeno utilizado. El análisis de los parámetros evaluados (valores hematológicos, fórmula leucocitaria absoluta, perfil de proteínas séricas, ganancia de peso, reactividad a derivado proteico purificado de *Mycobacterium avium* subsp. *avium* (PPA)) indicó que el tratamiento con LAM no indujo alteraciones detectables, esto podría constituir un primer acercamiento a la evaluación de la inocuidad del inmunomodulador. Se evaluó la respuesta inmune innata a través de la detección de la producción de intermediarios reactivos de oxígeno en células periféricas adherentes a tiempo 0 (preinmunización) y a tiempo final (15 días post-tercera inmunización) y se ha detectado una disminución de la producción de los intermediarios reactivos del oxígeno en el grupo G-OVALAM evaluado a tiempo final.

La modulación producida en la respuesta inmune celular se evaluó a través de la proliferación de células mononucleares estimuladas con mitógenos y antígenos, las subpoblaciones de linfocitos en sangre periférica, la producción de IFN γ a tiempo 0 y tiempo final y la hipersensibilidad cutánea

específica. Se detectó un incremento en la respuesta proliferativa de aquellos animales pertenecientes al grupo G-OVALAM indicando que el LAM incrementa la respuesta inmune celular específica y con mitógenos como ConA. Se ha detectado un aumento en la producción de $\text{IFN}\gamma$ en sobrenadantes de cultivo de células mononucleares estimuladas *in vitro* con OVA y ConA, en los animales tratados con LAM con niveles de entre 600 y 800 pg/mL. Se obtuvo además, un incremento en el porcentaje de células con el marcador CD25 en superficie. La expresión de este marcador se relaciona con el incremento de subpoblaciones con funciones reguladoras aunque aún estas funciones no se han demostrado en bovinos. Dado que la respuesta específica frente a derivado proteico purificado de *Mycobacterium bovis* no pudo ser detectada en los grupos inoculados con LAM como inmunomodulador, los resultados obtenidos indican que la modulación por LAM no interfiere con el diagnóstico de tuberculosis *in vivo* ni en el de paratuberculosis *in vitro*. Se evaluó la cinética de respuesta específica de anticuerpos frente a OVA a los días 0, 21, 42 y 57 y la respuesta de isotipos utilizando anticuerpos anti IgM, IgG1, IgG2 e IgG3 bovinos. Los resultados obtenidos muestran que la modulación por LAM en bovinos indujo anticuerpos específicos de alto título desde la primera inmunización. Estos niveles se incrementaron en la segunda dosis y se mantuvieron luego de la tercera inmunización. La respuesta sérica predominante frente a OVA es IgG1 e IgG2 y en menor proporción IgG3. La relación entre IgG1/IgG2 mostró una disminución en los animales inmunizados junto con LAM. Esto sugiere una tendencia de LAM a inducir una respuesta de tipo Th1.

Este trabajo de tesis nos permitió conocer el efecto del agregado de LAM al adyuvante de Freund incompleto como posible modulador hacia una respuesta de tipo Th1 frente a OVA inoculada simultáneamente.

ABSTRACT



ABSTRACT

Vaccination is the most effective method to control an infection. Effective vaccines induce a protective immune response by activating T and B lymphocytes, which, converted into memory cells, control infections caused by the pathogens included in the vaccine formulation. Vaccines made from inactivated viruses or bacteria or subunits have the ability to generate an efficient specific immune response. However, this response is sometimes weak because the viruses or bacteria do not multiply inside the host. Because of this, the use of adjuvants is required to enhance the immune response. The selection of an appropriate adjuvant can not only enhance the immune response, but also modulate the immunoglobulin isotype and the type of profile (Th1 or Th2) produced.

Lipoarabinomannan (LAM) is non-covalently bound to the plasma membrane of mycobacteria and extends to the outer part of the cell wall. This molecule plays an important role in the physiology of bacteria as well as in the modulation of the host immune response during infection. Several groups of researchers have described the effects of mycobacteria as adjuvants and modulators inducing a Th1 response when added to vaccines.

The aim of this thesis was to evaluate the effect of the application of ovalbumin (OVA) together with LAM and incomplete Freund's adjuvant (IFA) on the specific cellular and humoral immune response of bovines to OVA.

LAM was extracted and purified from *Mycobacterium avium subsp. avium* using a chemical extraction, as previously (Hamasur et al., 1999). The yield obtained was similar to that obtained by those authors. Using the monoclonal antibody that specifically recognizes LAM of *Mycobacterium tuberculosis*, we confirmed that the structure of LAM obtained from cultures

of *Mycobacterium avium subsp. avium* retains a high degree of antigenic similarity to that of *Mycobacterium tuberculosis*.

A total of 22 crossbred calves between 10 and 12 months of age were used. Calves were randomly assigned to four treatment groups: **G-IFA**, immunized with PBS and 1 mL of IFA; **G-LAM**, immunized with LAM (1 mg/dose) and IFA; **G-OVA**, immunized with OVA (1 mg/dose) and IFA; and **G-OVALAM**, immunized with OVA, IFA and LAM. Animals were immunized subcutaneously on days 0, 21 and 42. Since one of the most important limiting factors for the use of adjuvants is the possible direct or indirect toxic effect on products derived from human consumption, a number of physiological parameters were evaluated to control the formulation of the immunogen used.

The analysis of these parameters (hematological values, complete blood count, serum protein profile, weight gain, and reactivity to purified protein derivative of *Mycobacterium avium subsp. avium* (PPA)) indicated that the treatment with LAM did not induce detectable alterations. This could be a first approach for the assessment of the safety of the immunomodulator. We then evaluated the innate immune response by detecting the production of reactive oxygen intermediates in adherent peripheral cells at time 0 (pre-immunization) and final time (15 days post-third immunization) and detected a decrease in the production of the reactive oxygen intermediates in the G-OVALAM group at the final time.

The modulation produced in the cellular immune response was assessed by the proliferation of mononuclear cells stimulated with mitogens and antigens, lymphocyte subpopulations in peripheral blood, IFN γ production at time 0 and final time, and specific skin hypersensitivity. A significant increase was detected in the proliferative response of the animals

belonging to the group G-OVALAM, indicating that LAM increases the specific cellular immune response with mitogens such as ConA.

An increase in IFN γ production was observed in culture supernatants of mononuclear cells stimulated *in vitro* with OVA and ConA, in animals treated with LAM at levels of between 600 and 800 pg/mL. An increase in the percentage of cells with the CD25 marker on the surface was also observed. The expression of this marker is associated with the increase in subpopulations with regulatory functions, although these functions have not been demonstrated in cattle. Since the specific response against purified protein derivative of *Mycobacterium bovis* could not be detected in groups inoculated with LAM as an immunomodulator, the results indicate that modulation by LAM does not interfere with the diagnosis of tuberculosis *in vivo* or with that of paratuberculosis *in vitro*.

The kinetics of the specific antibody response against OVA was evaluated on days 0, 21, 42 and 57, whereas the response of isotypes was analyzed using bovine IgM, IgG1, IgG2 and IgG3 antibodies. The results show that the modulation by LAM in cattle induced specific high titers of antibodies as from the first immunization. These levels increased with the second dose and remained at the same level after the third immunization. The serum response against OVA was predominantly IgG1 and IgG2, and IgG3 to a lesser extent. The IgG1/IgG2 relationship showed a decrease in the animals immunized with LAM. This suggests a trend of LAM to induce a Th1 response.

This thesis allowed determining the effect of the addition of LAM to the incomplete Freund's adjuvant as a potential modulator to a Th1 response against OVA when it is simultaneously inoculated.

INTRODUCCIÓN



1. BREVE REVISIÓN HISTÓRICA DE LA INMUNOLOGÍA

La Inmunología es, en la actualidad, una ciencia autónoma y madura, pero previamente ha estado estrechamente ligada a la Microbiología. Su objeto, en sus orígenes, consistió en el estudio de la respuesta inmune que desarrollaban los animales frente a la invasión por microorganismos o partículas extrañas. En la actualidad, se la define como una rama de la biología que se ocupa del estudio del sistema inmune; entendiendo como tal al conjunto de órganos, tejidos y células que tienen como función biológica el reconocer elementos propios o extraños, estimular mecanismos efectores, regular esta respuesta e interaccionar con otros sistemas del organismo, como el nervioso y endócrino. La Inmunología estudia la funcionalidad del sistema inmune tanto en estadios de salud como de enfermedad (autoinmunidad, hipersensibilidades, deficiencias) y las reacciones frente a los trasplantes.

Como tantas otras ciencias, la Inmunología presenta un prolongado período pre-científico, de observaciones y aproximaciones meramente empíricas.

1.1. Historia de la Inmunología

La resistencia a posteriores ataques de una enfermedad infecciosa fue descrita en escritos desde la antigüedad:

- ✓ Siglo XI a.C. - En la antigua China se había observado que las personas que en su niñez habían padecido de viruela, no la volvían a padecer más adelante.

- ✓ Siglo XIX a.C.- El historiador griego Tucídides narra que en una epidemia ocurrida durante la guerra del Peloponeso, los enfermos eran atendidos solo por aquellas personas que habían sobrevivido previamente a la enfermedad, con la seguridad de que éstas no volverían a ser contagiadas.
- ✓ A fines del siglo XVIII, Edward Jenner observó que las personas que habían adquirido la viruela vacunal (enfermedad que se contagiaban de las vacas durante el ordeño y que sólo producía pústulas en las manos), no eran atacadas por la grave viruela humana. Por lo tanto, propuso inocular fluido, procedente de estas pústulas, obtenido de un adulto, a un niño, y logró protección. Jenner publicó sus resultados en 1798, en los que pronosticó que la aplicación de su método podría llegar a erradicar la viruela.
- ✓ A fines del siglo XIX, Louis Pasteur. Durante sus estudios sobre la bacteria responsable del cólera aviar (más tarde conocida como *Pasteurella aviseptica*), observó que la inoculación de cultivos viejos (poco virulentos), en gallinas las protegía de contraer la enfermedad, cuando posteriormente eran desafiadas con cultivos frescos y virulentos. De esta forma, obtuvo la primera **VACUNA** a base de microorganismos atenuados. Además comprobó que, cultivos de *Bacillus anthracis* atenuados por incubación a 45°C, conferían inmunidad a ovinos expuestos al contagio por carbunco. Identificó que el virus de la rabia, proveniente de extractos medulares de conejos infectados, perdía virulencia cuando se mantenía al aire durante cierto tiempo, y propuso su empleo como vacuna. Así, el 6 de julio de 1885, Pasteur realizó la primera vacunación antirrábica en el niño Joseph Meister, que había sido mordido por un perro rabioso.

1.2. Teorías sobre la inmunidad

- ✓ En 1883 Ilya Ilich Mechnikov, al estudiar fenómenos de englobamiento de partículas extrañas por los leucocitos de conejo y de humanos, estableció su "Teoría de los fagocitos". Describió la eliminación de agentes patógenos por medio de "células devoradoras" (fagocitos) que actuaban en animales vacunados contra el carbunco. Más tarde, propuso la idea de que los fagocitos segregan enzimas específicas (1900). Este postulado constituyó el núcleo de la teoría de la inmunidad celular, y se consideró a la fagocitosis como la base principal del sistema inmune del organismo.
- ✓ La escuela alemana de Robert Koch hizo hincapié en la importancia de los mecanismos humorales. Emil von Behring y Shibasaburo Kitasato, quienes trabajaban con toxinas tetánica y diftérica, observaron que se producían "antitoxinas" (más tarde conocidas como **anticuerpos**) que circulaban en el suero y que neutralizaban las toxinas de forma específica, y demostraron que podían proteger a animales expuestos a una dosis letal de la toxina correspondiente (1890). Paul Ehrlich, postula la "Teoría de las cadenas laterales en la superficie de células". Explicando que ante un estímulo estas antitoxinas se producían en gran cantidad y se secretaban (Inmunidad Humoral).
- ✓ En 1898, Jules Bordet descubre otro componente sérico relacionado con la respuesta inmunitaria, al que bautiza como "alexina", caracterizado por su termolabilidad e inespecificidad (más tarde se impondría el nombre de **Complemento**). En 1904, Almorth Wrigth y Stewart R. Douglas descubren las **opsoninas** presentes en los sueros de animales inmunizados que tras unirse a

la superficie bacteriana, incrementaban la capacidad fagocítica de los leucocitos.

A partir del siglo XX y hasta la actualidad los avances en el estudio de la respuesta inmune han sido tan importantes que se conoce gran parte de sus mecanismos, tanto a nivel génico como funcional. A partir de estos conocimientos, se han desarrollado vacunas que han sido muy exitosas contra una amplia gama de patógenos, con un gran impacto en la salud tanto humana como animal. Sin embargo, a pesar de los grandes avances, aún no se han encontrado vacunas efectivas contra varias enfermedades que afectan a la población humana y animal a nivel mundial como la malaria, la leishmaniasis y la tuberculosis.

2. VISIÓN ACTUAL DEL SISTEMA INMUNE

Cuando un microorganismo ingresa en un vertebrado, el sistema inmune responde a través de diversos mecanismos con el objeto de eliminar o limitar la diseminación del patógeno. Se producen dos tipos de respuestas, la innata y la adaptativa.

La respuesta inmune innata (RII) implica el reconocimiento inmediato de estructuras antigénicas comunes a muchos microorganismos por parte de células del sistema inmune con funciones efectoras rápidas. Por otro lado, la respuesta inmune adaptativa (RIA) está mediada por linfocitos B (LB) y T (LT) que poseen receptores específicos. El conjunto de linfocitos expresan en total aproximadamente mil millones de receptores específicos diferentes, por lo que existen sólo unas pocas células específicas para cada antígeno (un antígeno es cualquier sustancia capaz de generar una respuesta inmune). Luego de la estimulación antigénica, se produce la inducción, expansión y activación de los linfocitos específicos. Este proceso se denomina expansión clonal. Una parte de los linfocitos maduran hacia células efectoras y el resto se perpetúan como células de memoria específicas. Éstas actúan en forma más rápida y eficiente frente a un segundo desafío con el mismo antígeno.

2.1. Respuesta inmune innata

La RII es la respuesta inicial de defensa. La mayoría de los microorganismos patógenos son eliminados por estos mecanismos antes de que la RIA sea activada. Los principales componentes de la RII son las barreras (físicas, químicas y biológicas), las células fagocíticas, los linfocitos, las células asesinas naturales o natural killer (NK) y los factores solubles. Estos últimos incluyen las proteínas del complemento, las proteínas de fase aguda (PFA) y las citoquinas que median la fagocitosis e inflamación. La

Tabla 1 muestra la función de los componentes humorales y celulares que de la RII.

Tabla 1: Principales componentes celulares y humorales de la RII

Celulares		Humorales	
	Los <u>macrófagos</u> poseen capacidad fagocítica. Inician y coordinan la respuesta innata mediante la producción de diversas citoquinas.	Sistema del Complemento	
	Los <u>neutrófilos</u> participan en la respuesta frente a bacterias y en procesos inflamatorios. Con su actividad fagocítica, suelen ser las primeras células en responder a la agresión.	Las proteínas del complemento se unen covalentemente a la superficie de ciertos microorganismos causando su destrucción (vía alterna y de las lectinas).	Intervienen en los procesos inflamatorios: atraen células fagocíticas (C3a, C4a, C5a), opsonizan (C3b, C4b) y lisan al patógeno por formación del complejo de ataque a membrana.
	Los <u>eosinófilos</u> tienen cierta capacidad fagocítica. Participan fundamentalmente en la respuesta frente a las infecciones parasitarias.	Citoquinas	
	Los <u>basófilos</u> contienen gránulos con heparina, leucotrienos, histamina y otras aminas vasoactivas.	<u>Interleuquinas</u> : IL-1; IL-6, IL-12 liberadas principalmente por macrófagos.	Intervienen en los procesos de inflamación y en la respuesta sistémica de fase aguda.
	Los <u>linfocitos T</u> con receptor $\gamma\delta$ intervienen en la respuesta inmune de los epitelios.	<u>Quimioquinas</u> : CXCL8 (IL-8), CC	Intervienen en la quimiotaxis de células fagocíticas.
	Los <u>linfocitos B1 CD5⁺</u> y los de la zona marginal del bazo sintetizan IgM de escasa afinidad que reconoce amplio número de bacterias.	<u>TNF-α</u> : producido por macrófagos	Interviene en los procesos de inflamación y en la respuesta de fase aguda.
	Las <u>células asesinas naturales</u> son linfocitos que destruyen células infectadas y tumorales sin estímulo previo, ni restricción por moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad.	<u>Interferones</u> : IFN- α y β producidos principalmente por células infectadas IFN- γ producido por células NK	Participan en la respuesta frente a virus. Activación de macrófagos y de células NK.
	Las <u>células dendríticas</u> son células presentadoras de antígenos que cumplen una función crítica en la inducción y regulación de la respuesta inmune adaptativa.		

Fuente: Doménech et al., 2008. Con modificaciones.

Los animales están expuestos constantemente a microorganismos, algunos de los cuales normalmente sólo colonizan al hospedador de manera comensal, otros son indispensables para la vida del huésped (en bovinos, por ejemplo, los infusorios del rumen degradan la celulosa a ácidos grasos volátiles y muchos pueden producir vitaminas indispensables para la vida del individuo) y otros son patógenos para ellos. En general, el desencadenamiento de un proceso patológico está relacionado con las características del microorganismo invasor, del estado fisiológico y genética del hospedador, así como también de las condiciones del medio ambiente en el que se desarrolla el encuentro. La mayoría de las barreras físicas y químicas de los rumiantes son similares al resto de las especies. Como característica particular, el ambiente ruminal constituye una barrera para algunos agentes infecciosos. El gran volumen, el tránsito lento, el ambiente anaeróbico y la microflora densa en el rumen inhiben el crecimiento y supervivencia de muchos patógenos.

A los pocos minutos que un patógeno supera las barreras anatómicas se inicia una RII. El mecanismo principal es la inflamación cuyos principales objetivos son destruir al patógeno, impedir que se extienda más allá del foco inicial de infección y reparar el tejido dañado. Esta respuesta es secuencial, su duración y consecuencias dependen, en gran medida, del tipo de patógeno. La primera línea de defensa son los macrófagos tisulares que, gracias a sus receptores de membrana, reconocen los componentes "extraños o no propios" de los microorganismos, y como consecuencia, liberan citoquinas (IL-1, IL-6, $\text{TNF}\alpha$) y otros mediadores químicos tales como quimoquinas (como IL-8) que inician la respuesta inflamatoria aguda y local.

Los TLRs (receptores tipo toll) son receptores a través de los cuales los fagocitos, reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) que se encuentran predominantemente en microorganismos. El descubrimiento de los TLRs, su importancia en la RII y su regulación de la

respuesta inmune adaptativa, clarificó los mecanismos por los cuales los componentes microbianos modifican la respuesta inmune. La activación de los TLRs produce una respuesta inmediata a través de cascadas de señalización y activación celular que lleva a la síntesis de citoquinas pro-inflamatorias (Akira, 2003; Kawai y Akira, 2009). Estas citoquinas atraen a neutrófilos fagocíticos al sitio de infección y causan la acumulación de proteínas plasmáticas, incluidas las proteínas del complemento. Estas proteínas favorecen la fagocitosis al opsonizar a los microorganismos, pero también tienen un efecto vasodilatador que incrementa la salida de más proteínas plasmáticas a los tejidos. Si la infección no logra controlarse en esta primera fase, horas después acuden al foco de infección más neutrófilos y monocitos. Una vez en los tejidos, los monocitos se diferencian a macrófagos que fagocitan a los microorganismos y también a otros fagocitos que han entrado en apoptosis una vez concluida su función. También, eliminan restos de tejidos lesionados por acción de los intermediarios reactivos de oxígeno y enzimas, liberados durante la fagocitosis. En ocasiones, los microorganismos no son fácilmente destruidos por la fagocitosis, como ocurre con las micobacterias. En este caso, el proceso inflamatorio persiste dando lugar a una reacción inflamatoria crónica con acumulación de macrófagos y linfocitos activados, que generan una lesión de tipo granulomatosa. Por otra parte, algunos mediadores inflamatorios producidos por los macrófagos actúan sobre las células endoteliales activando los mecanismos de coagulación de los vasos sanguíneos locales, impidiendo así que la infección se extienda por vía sanguínea. Además, las infecciones virales inducen interferones, que confieren un estado antiviral a las células próximas. Simultáneamente la IL-12 sintetizada por los macrófagos activa a las células NK. Estas células son decisivas en la inmunidad innata frente a patógenos intracelulares.

Si no se elimina la infección, los fluidos y las células acumulados drenan hacia los ganglios linfáticos locales, donde se inicia la RIA.

Cuando ocurre una inflamación en cualquier sitio de un organismo, éste también responde durante los primeros días con una serie de reacciones que ayudan a protegerse en su totalidad y que constituyen la llamada “respuesta de fase aguda”. Esta respuesta sistémica tiene como mediadores principales a tres citoquinas producidas por los macrófagos, IL-1, IL-6 y TNF- α . Su acción combinada a nivel sistémico origina en primer lugar fiebre, seguida por la disminución del apetito, somnolencia y neutrofilia. Además se estimula la producción de las proteínas de fase aguda (PFA) por los hepatocitos. Éstas incluyen la proteína C reactiva (PCR), la proteína amiloide del suero, el fibrinógeno y la lectina fijadora de manosas, entre otras. Estas proteínas se unen a PAMPs, componentes de ciertas superficies bacterianas y fúngicas funcionando como opsoninas y activando el complemento. Por ejemplo, la PCR se une a lipopolisacáridos (LPS) de la pared celular bacteriana y fúngica. Esta respuesta de fase aguda consigue que a los pocos días de inicio de la infección, el organismo disponga de moléculas inespecíficas con acción similar a las inmunoglobulinas (opsonización del patógeno y activación del complemento) (Doménech et al., 2008; Tizard, 2009).

Los mecanismos de RII se encuentran conservados en los vertebrados. Por lo tanto, en rumiantes, en general son similares a los de otras especies, aunque con algunos aspectos diferenciales. A saber, la PCR bovina no se incrementa en la respuesta de fase aguda. Mientras que, se describe como principal PFA a una proteína llamada congulinina, identificada sólo en rumiantes. Esta proteína facilita la fagocitosis y remoción de células alteradas pues se une al C3b sobre la superficie celular por varios sitios, formando grupos o “clumps” (Dec y Wernicki, 2006; Gupta y Surolia, 2007),

En los bovinos se describen una serie de péptidos catiónicos en gránulos dentro de los neutrófilos como bactenecina, TAP e indolicina (Rivas et al., 2006).

Los neutrófilos junto con los macrófagos son las principales tipos celulares con función fagocítica en bovinos y actúan de manera similar que en otras especies. Son la principal línea de defensa contra infecciones, especialmente bacterianas y su actividad se potencia por la presencia de anticuerpos (Acs) y citoquinas producidos por LT, por eso también juegan un papel importante en la inmunidad específica. Los bovinos sanos tienen aproximadamente la mitad de neutrófilos que linfocitos en sangre periférica (2500 células/ μ L y 6200 células/ μ L respectivamente). Se ha demostrado que su función es subóptima en terneros jóvenes y en vacas en el periparto. Además, median citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC del acrónimo en inglés) en forma similar al resto de las especies y, citotoxicidad celular independiente de anticuerpos si están activados por $\text{TNF}\alpha$. Como los macrófagos, pueden secretar $\text{TNF}\alpha$ durante la RII, dicha citotoxicidad puede ser un componente importante en este tipo de respuesta. Expresan en su superficie el receptor CD32 (receptor para $\text{FC}\gamma\text{II}$) que se une a complejos inmunes que poseen IgG2. El ingreso del antígeno opsonizado a través de este receptor desencadena su ingestión y estallido respiratorio (Godderis, 1998).

Los macrófagos se encuentran en la mayoría de los tejidos bovinos. Algunos de los más importantes son: las células de Kupffer en el hígado, las células de la microglia en el cerebro, los macrófagos alveolares en pulmón, los macrófagos de piel, de tejidos linfoides y mamarios. Los macrófagos bovinos en reposo son capaces de fagocitar y matar algunos agentes infecciosos. Ellos se vuelven mucho más eficientes y agresivos cuando son activados por citoquinas producidas por los LT. Al menos una parte de la

población de macrófagos bovinos es capaz de producir radicales oxígeno y óxido nítrico como mecanismos microbicidas.

La densidad de los mastocitos bovinos en el tracto respiratorio normal es mayor que en otras especies y la concentración de dopamina también.

En bovinos, las células linfoides con actividad NK son tan grandes como los linfocitos pero no tienen gránulos en su citoplasma. Las NK bovinas exhiben en su superficie marcadores como CD3, CD4, CD5, CD6 y WC1 (marcador de $LT\gamma\delta$). Son ineficientes para lisar células tumorales *in vitro*, típicamente usadas para evaluar la función celular de las NK de otras especies, a menos que estén previamente activadas por citoquinas. Por otro lado, se ha demostrado que no requieren activación para eliminar células como MDBK infectadas por virus (Godderis, 1998).

Las células natural killer T (NKT) reconocen lípidos presentados a través de las moléculas CD1d. Estas células producen grandes cantidades de $IFN\gamma$ cuando se activan y constituyen una primera línea de defensa contra muchos patógenos. Estas células son LT que expresan tanto TCR como receptores característicos de las células NK (Bendelac et al., 1997). En bovinos, sin embargo, no se han encontrado evidencias de presentación a través de CD1d por lo que se considera que no se pueden estimular estas células. Aún no se ha encontrado algún tipo celular, similar a las NKT, que compense dichas funciones en la especie bovina (Van Rhijn et al., 2006).

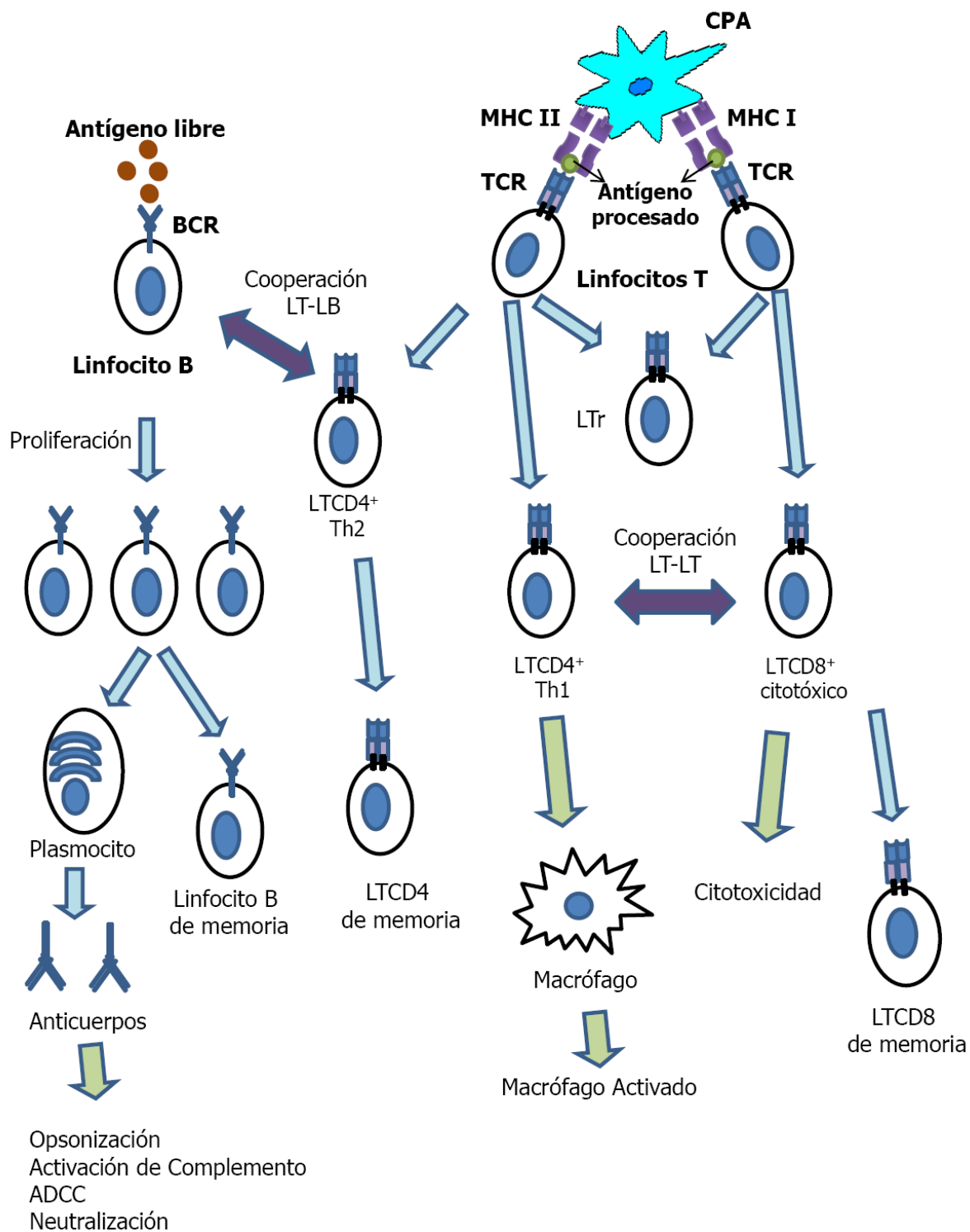
2.2 Respuesta inmune adaptativa

La RIA está mediada por la acción e interacción de dos grupos de células: Los linfocitos y las células presentadoras de antígeno (CPA). Se caracteriza por ser **específica** ya que reconoce diferencias sutiles entre los antígenos, **diversa**, ya que se estimulan diferentes mecanismos efectores

según el antígeno y posee **memoria**, dado que en un segundo encuentro con los mismos antígenos la respuesta es más rápida y efectiva.

La RIA se suele dividir en respuestas humorales y celulares. La respuesta humoral está mediada principalmente por anticuerpos (Acs) o inmunoglobulinas (Igs), que son glicoproteínas que reconocen específicamente a los antígenos. Mientras que, la respuesta celular, por otra parte, está mediada por LT en su mayoría linfocitos T "helper" (LTh), linfocitos T citotóxicos (LTc) y macrófagos activados.

La inducción de la respuesta inmune adaptativa y los mecanismos efectores que se ponen en marcha se muestran en la Figura 1.

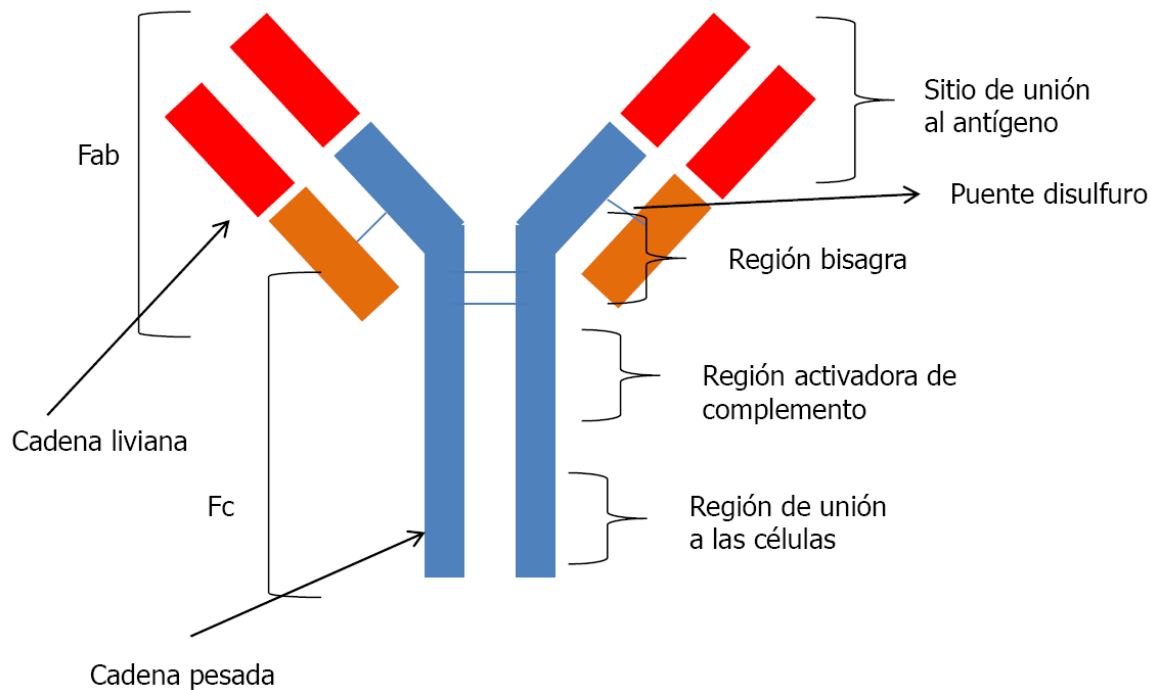
Figura 1: Inducción de la RIA y mecanismos efectores

2.2.1. Respuesta inmune humoral

La célula más importante de la respuesta humoral es el LB. Cada LB se diferencia en la médula ósea y está recubierto por receptores de células B (del acrónimo en inglés, BCR). Los BCR son glicoproteínas pertenecientes a la familia de las Igs compuestas por cuatro cadenas peptídicas (dos cadenas pesadas y dos cadenas livianas). Las cadenas livianas están unidas a las cadenas pesadas por un puente disulfuro y conforman el sitio de unión al antígeno (Figura 2). La base de la molécula formada por las dos cadenas pesadas se la denomina fracción cristalizable (Fc) y está anclada a la membrana de los LB por una cadena transmembrana (Figura 2) cuando se encuentra unida a ella. Cuando el BCR es secretado por el LB se lo denomina anticuerpo. Los LB reconocen antígenos de forma nativa a través de su BCR.

En el caso de antígenos de naturaleza proteica (antígenos T-dependientes), la estimulación completa de los LB requiere de varias señales coestimulatorias otorgadas por el LTh (cooperación LT-LB). Por lo tanto, aunque la unión del antígeno proteico al BCR es un paso esencial en la respuesta inmune humoral es insuficiente para la secreción de anticuerpos en todos los casos.

Los LB que responden a antígenos de naturaleza proteica se denominan LB2.

Figura 2: Estructura de un anticuerpo

Los LB1 tienen la capacidad de autorrenovarse localmente, es decir, de expandirse sin el estímulo antigénico. La principal función de los LB1 es la producción de Acs dirigidos contra antígenos bacterianos no proteicos, como polisacáridos, lipopolisacáridos y fosfatidilcolina. A este tipo de antígenos se los denomina T-independientes. Los LB1 se diferencian a productores de anticuerpos en respuesta al reconocimiento de antígenos T-independientes o producen anticuerpos de tipo IgM (denominados naturales).

Las funciones efectoras de los anticuerpos están asociadas con la estructura de éstas moléculas. La combinación a nivel genético que se produce entre las porciones variables y constantes de los anticuerpos permite mantener la especificidad y obtener moléculas con diferentes funciones biológicas.

Entre las funciones efectoras de los Acs se encuentra la neutralización, que consiste en la unión y el bloqueo de la penetración del patógeno en el organismo o en una célula. También pueden actuar mediando la activación del sistema de complemento o activando respuestas celulares a través de los receptores para Fc como la opsonización y la ADCC.

En la especie bovina se describen 5 clases (isotipos) de Igs que se diferencian por la estructura de las cadenas pesadas. En la Tabla 2 se muestran las diferentes clases de anticuerpos bovinos (isotipos).

Tabla 2: Isotipos de Acs identificados en bovinos

Isotipo	
Cadena pesada	γ (IgG1, IgG2 e IgG3)
	α (IgA)
	ϵ (IgE)
	μ (IgM)
	δ (IgD)
Cadena liviana	λ
	κ (expresada en bajo nivel en bovinos)

Fuente: Zhao et al., 2006.

Los diferentes isotipos varían según la especie animal en cuanto a su función y a su concentración. En rumiantes por ejemplo, en secreciones de la glándula mamaria existe un predominio relativo de IgG1 con respecto a IgA.

La placenta de rumiantes no permite el pasaje de inmunoglobulinas al feto por lo que, la transferencia de inmunidad pasiva en bovinos está determinada por la acumulación de altas concentraciones de Acs, particularmente IgG1, en calostro. El receptor de IgG neonatal (FcRn) es responsable por el transporte de inmunoglobulinas de isotipo IgG1 del plasma materno a través de la barrera mamaria hacia el calostro. Luego de la ingestión de calostro las inmunoglobulinas son transportadas a través de la barrera intestinal del neonato a circulación (Kacskovics, 2004; Cervenak y Kacskovics, 2009). Tal como fue expuesto anteriormente, la IgG es de importancia debido a su papel en la inmunidad del feto y su vida media larga en circulación. (Cervenak y Kacskovics, 2009). Se relaciona al isotipo IgG1 con el bloqueo de bacterias y toxinas en el sitio de infección. Los bovinos poseen un receptor Fc en macrófagos y neutrófilos (receptor para FC γ II) que se une sólo a IgG2 por eso se la asocia al incremento de la fagocitosis en infecciones bacterianas agudas (Kacskovics, 2004; Tizard, 2009).

El isotipo IgA predomina en secreciones intestinales, nasales y lagrimales. En el intestino, la IgA se produce localmente, mientras que, la mayoría de la IgG es derivada de plasma. En contraste, la IgA en saliva no es producida localmente pero es transferida selectivamente desde la sangre por un receptor para Igs presente en el epitelio glandular (Godderis, 1998; Estes y Brown, 2002).

El isotipo IgE es el responsable de la hipersensibilidad inmediata, se une a mastocitos y juega un papel importante en la resistencia a parásitos, particularmente infecciones por helmintos. También, es secretado en el calostro como la IgE en otras especies.

2.2.2. Respuesta inmune celular

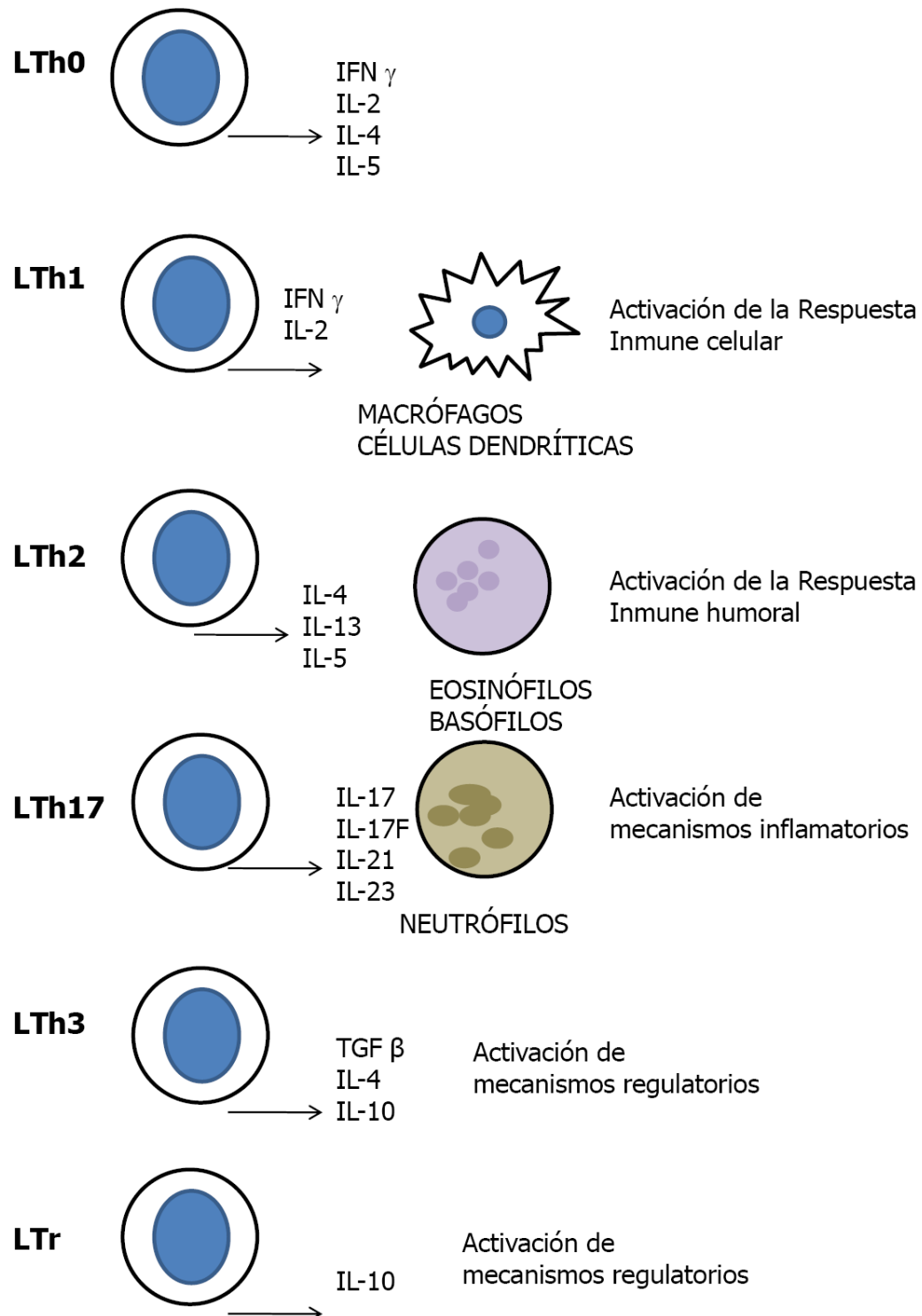
El componente clave de la respuesta celular es la interacción entre el LT y la CD. El LT se genera en la médula ósea y migra al timo para completar su maduración. Los LT se caracterizan por la expresión en sus membranas de un receptor de reconocimiento al antígeno llamado el receptor de células T (del acrónimo en inglés TCR). Cada TCR consta de dos cadenas peptídicas de unión al antígeno, vinculadas con otras moléculas que amplifican y transmiten la señal generada. Se han identificado dos tipos de TCR, uno con cadenas peptídicas denominadas gamma (γ) y delta (δ), y el otro con cadenas denominadas alfa (α) y beta (β). En humanos, ratones y probablemente en la mayor parte de los mamíferos no rumiantes entre el 90 y 99% de los LT periféricos expresan receptores de tipo $\alpha\beta$. Mientras que, en rumiantes los LT con TCR de tipo $\gamma\delta$ constituyen entre el 10 y el 40% de la población de linfocitos periféricos (Tizard, 2009). Los TCRs no reconocen el antígeno directamente, sino a través de proteínas presentadoras del antígeno llamadas moléculas de histocompatibilidad (MHC). Las MHC de clase I se expresan en casi todas las células nucleadas y las MHC de clase II se expresan solamente en células presentadoras del antígeno (CD, macrófagos y LB).

Cuando un LT reconoce un antígeno presentado por una molécula del MHC, prolifera y se activa. Los LT presentan diferentes perfiles fenotípicos y funcionales. Existen diferentes subpoblaciones de LT: los LTh, que expresan la molécula CD4 en su superficie, los LTc que expresan la molécula CD8 en su superficie, los linfocitos T reguladores (LTr) que inhiben la expansión clonal de LT y la producción de citoquinas y los LT de memoria que permiten una rápida respuesta a la re-exposición frente al mismo antígeno.

Los LTh pueden encontrarse en diferentes perfiles de acuerdo a su estado funcional y se caracterizan por el patrón de citoquinas que producen

(Mosmann y Coffman, 1989). La presencia de IL-12 y otras citoquinas relacionadas promueve la diferenciación de LTCD4⁺ a Th1, dichas células producen IFN γ , inducen reacciones de hipersensibilidad retardada, activan macrófagos y son esenciales para la respuesta contra patógenos intracelulares. Mientras que, la presencia de IL-4, conduce a la diferenciación hacia un perfil Th2. Éstas células son importantes en la inducción de la producción de IgE, reclutamiento de eosinófilos hacia el sitio de inflamación y la eliminación de parásitos y bacterias extracelulares. Los LTh3 se caracterizan por secretar principalmente TGF- β junto con cantidades menores de IL-10 e IL-4. Aunque las subpoblaciones antes descritas suelen considerarse subconjuntos bien delimitados, existen otras subpoblaciones de LT como los Th0 que secretan una mezcla de citoquinas representativa tanto de LTh1 como de LTh2. Secretan IL-2, IL-4, IL-5 e IFN γ . Más recientemente, se demostró que los LT podían producir citoquinas que no podrían ser clasificables dentro de los perfiles Th1 o Th2, a saber, la IL-17, es producida por los LT que no producen ni IFN γ ni IL-4, y se los denomina Th17, y su papel parecería ser el de inducir inflamación (Miossec et al., 2009).

En la Figura 3 se muestran las subpoblaciones de LTCD4⁺ y sus funciones efectoras.

Figura 3: Linfocitos TCD4⁺ y sus funciones efectoras

Los LT CD4⁺ en rumiantes constituyen aproximadamente entre el 20 y el 30% de los linfocitos de sangre periférica. Los LT CD4⁺CD8⁻ se encuentran entre el 15 y el 30% en adultos y hasta un 80% en animales jóvenes, la mayor parte de estas células negativas corresponden a LT $\gamma\delta$ y expresan el marcador de superficie WC1 característico de los rumiantes (Hein y Mackay, 1999; Howard y Morrison, 1999; Tizard, 2009).

2.2.3. Perfiles de linfocitos y anticuerpos

Está bien establecido que se requiere de los LTh para la generación de un cambio de isotipo y la producción de diferentes subclases de anticuerpos durante la RIA. Estudios realizados en ratones han demostrado que los factores de transcripción (por ejemplo GATA3) se correlacionan con una inducción temprana del desarrollo de un perfil Th2 (Zheng y Flavell, 1997). Por otro lado, el factor de transcripción que induce el desarrollo del perfil Th1 es t-bet. Algunos experimentos realizados *in vitro* en la especie bovina indicaron que la polarización de los perfiles de linfocitos se asocia a la expresión de isotipos característicos de IgG. La IL-4 induciría un aumento de IgG1 e IgE sobre IgG2 y se relacionaría con el perfil Th2, mientras que el IFN γ bovino induciría el aumento de IgG2 sobre la producción de IgG1 asociado al perfil Th1 (Estes y Brown, 2002).

2.2.4. Regulación de la respuesta inmune

Los mecanismos efectores activados por la presencia del antígeno son controlados por mecanismos reguladores a fin de mantener la homeostasis del sistema inmune. Para cada tipo de mecanismo que se activa, simultáneamente el sistema inmune pone en marcha uno o varios mecanismos capaces de modularlo. Por ejemplo, la activación del sistema de complemento está regulada por un conjunto de proteínas séricas y receptores celulares cuya actividad impide el daño a las células propias. Los

macrófagos, al activarse producen citoquinas anti-inflamatorias que inhiben su capacidad de destrucción.

En relación a los LT, al activarse expresan moléculas de superficie como CTLA4 que inhiben la expansión clonal. Además, la actividad de los LTh1, LTh2 y LTc está regulada por los LTr. Estas células cumplen una función central en el control de la respuesta inmune, tienen la capacidad de inhibir la expansión clonal y la expresión de citoquinas de los LT efectores. Algunas provienen del timo como tales y se las denomina LTr naturales (expresan el fenotipo $CD4^+CD25^+$ y el represor transcripcional FOXP3). Su función principal es el mantenimiento de la tolerancia a los antígenos propios. Otras son inducidas en los órganos linfáticos secundarios y se las denomina LTr inducibles, que median su actividad supresora a través de dos mecanismos centrales:

- ✓ La inducción de citoquinas inhibitorias como IL-10 ó TGF- β .
- ✓ Establecimiento de interacciones directas, célula-célula con los LT efectores.

Las primeras demostraciones de la presencia de células reguladoras en bovinos han sido publicadas por Seo et al. (2007), quienes demostraron la presencia de células reguladoras en experimentos donde utilizaban superantígenos. En esos experimentos han detectado la presencia de $CD4^+CD25^+$ y $CD8^+CD25^+$ además de identificar el gen FOXP3 característico de las células reguladoras. Estudios realizados por Hoek et al. (2009) demostraron un aumento en la subpoblación de $CD4^+CD25^+$ en bovinos cuando se cultivaban *ex vivo*, pero en estas condiciones no se han detectado sus funciones reguladoras, por lo tanto su papel en la especie bovina se encuentra aún en discusión.

2.2.5. Memoria inmunológica

Durante la expansión clonal, algunas células se diferencian en células de memoria. Se caracterizan por persistir en el tiempo y patrullar el organismo en forma constante. Cuando hay una segunda exposición al antígeno, las células de memoria generadas en la respuesta primaria proliferan más rápidamente en un proceso conocido como respuesta secundaria (Fainboim, 2005; Tizard, 2009).

3. VACUNAS Y ADYUVANTES

La vacunación es el método más efectivo para proteger de una infección. De hecho, la erradicación de la viruela, la eliminación de la peste porcina clásica en México o Costa Rica, de la brucelosis en países como Suecia o Finlandia no podrían haber sido posibles sin la utilización de vacunas efectivas. Además se utilizan en forma cotidiana para controlar enfermedades como la fiebre aftosa, el moquillo canino, la seudorrabia y la peste bovina.

Las vacunas efectivas inducen una respuesta inmune protectora, activando LT y LB, que convertidos en células de memoria controlan infecciones producidas por el patógeno incluido en la formulación de la vacuna (McKee et al., 2010). El desarrollo de vacunas requiere de la identificación de antígenos de los patógenos y su aplicación para la inducción de una respuesta inmune suficiente para generar protección. Actualmente, se utilizan varios tipos de vacunas:

- ✓ A microorganismos vivos atenuados, compuestas por virus o bacterias similares a los microorganismos pero con menor patogenicidad.
- ✓ Inactivadas, que están formadas por microorganismos inactivados químicamente o por calor.
- ✓ A subunidades, que incluyen sólo algunos componentes del patógeno.
- ✓ Deleteadas o con genes marcadores heterólogos.
- ✓ A vectores de expresión vivos, que expresan genes heterólogos para antígenos inmunogénicos.
- ✓ A ADN, en las cuales el ADN del antígeno se inserta en un plásmido bacteriano que se utiliza como vector de expresión en las células del individuo vacunado.

Las vacunas elaboradas con virus o bacterias inactivados o a subunidades tienen la capacidad de generar una respuesta inmune específica eficiente, pero a veces débil ya que no se multiplican en el huésped. Es por eso, que requieren el uso de sustancias que potencien la respuesta inmune. Estos agregados a la formulación de las vacunas que amplifican o influyen en la respuesta inmune adaptativa se conocen como **adyuvantes** (McKee et al., 2010).

Los adyuvantes son sustancias que, inyectadas junto con un antígeno, permiten la potenciación de la respuesta inmune humoral y celular inducida por mismo el antígeno. Se utilizan para mejorar la cinética (inducción y duración) y actuar sobre los aspectos cualitativos y cuantitativos de la respuesta inmune. El agregado de adyuvantes generalmente permite la utilización de menor masa antigénica, un menor número de dosis y la modulación de la respuesta inmune a generar (Stills y Stills, 2005; Kwissa et al., 2007; Hauguel et al., 2008; Reed et al., 2009; McKee et al., 2010).

3.1. Mecanismos de acción de los adyuvantes

Los mecanismos de acción de los adyuvantes a través de los cuales promueven un aumento en la respuesta inmune son los siguientes:

- ✓ la generación de depósitos
- ✓ la mejora de la presentación antigénica
- ✓ la distribución del antígeno
- ✓ la inducción de LTc
- ✓ la modulación de la producción de citoquinas

3.1.1. Generación de depósitos

Este efecto consiste en la protección del antígeno tanto de la dilución como de la degradación rápida, logrando retardar su eliminación. Los adyuvantes que actúan por este mecanismo inducen la liberación lenta del antígeno intacto, lo que permite una prolongada exposición de las células del sistema inmune con bajos niveles de antígeno. Se logra una estimulación continua de los LB, dando como resultado una mayor producción de anticuerpos. Son ejemplos de este tipo de adyuvantes: el hidróxido de aluminio, que al mezclarse con al antígeno induce la formación de un granuloma rico en macrófagos; el adyuvante de Freund incompleto (AFI), que se inyecta junto con al antígeno en forma de emulsión agua-aceite y estimula una respuesta inflamatoria local crónica, de tipo granuloma, en el sitio de inoculación.

3.1.2. Presentación antigénica

Se refiere a la capacidad de un adyuvante de preservar la integridad conformacional de un antígeno y presentarlo de forma apropiada a las células efectoras del sistema inmune. Esto ocurre cuando un adyuvante interacciona con un antígeno de forma tal que los epitopes conformacionales se mantienen estables. El mayor beneficio de estos adyuvantes *in vivo* es un aumento de la vida media del antígeno, lo que favorece la interacción con células del sistema inmune. Son ejemplos de este mecanismo de acción las saponinas, los liposomas, los complejos inmunoestimulantes (ISCOMs) y las micropartículas.

3.1.3. Distribución del antígeno

Se define como la capacidad de un adyuvante de transportar un inmunógeno a las células efectoras del sistema inmune, generalmente a través de las CPA. El adyuvante interacciona con el antígeno de forma tal

que produce agregados multimoleculares. Estos agregados aumentan la incorporación por parte de los macrófagos y CD que actúan como CPA. Los ejemplos son ISCOMs, el AFI y LPS.

3.1.4. Inducción de respuestas citotóxicas producidas por LTc

La inducción de respuestas citotóxicas requiere que el antígeno sea procesado dentro del citosol. Para ello, el adyuvante, debe facilitar la incorporación y persistencia de los péptidos en el contexto de la MHCI. La forma de acción de estos adyuvantes es por la capacidad de interaccionar con las membranas celulares de forma tal que el antígeno asociado se incorpore al citosol y sea procesado. Esto puede ocurrir por fusión con la membrana celular externa, por endocitosis o pinocitosis seguida por la ruptura de la membrana del endosoma. Aunque la mayoría de las células presentan antígenos por MHCI, la célula blanco más efectiva que induce respuesta citotóxica es una CPA. Como ejemplo de adyuvantes que poseen este mecanismo de acción, podemos nombrar a los ISCOMS y el adyuvante de Freund completo (AFC).

3.1.5. Producción de citoquinas

Se refiere a la capacidad de algunos adyuvantes de modificar la red de citoquinas secretadas. El uso de estos adyuvantes puede resultar en un incremento de la producción de la mayoría de las citoquinas, pero lo más común es que se active la producción de algunas citoquinas y se inhiban otras. Muchos de estos adyuvantes son productos microbianos complejos (PAMPs), que activan a las CD y macrófagos a través de los TLRs. Por ejemplo, LPS, lípido A y monofosforil lípido A, son reconocidos por el TLR4, y se los ha probado en su acción como adyuvantes (Akira y Hemmi, 2003; Stills, y Stills, 2005; McKee et al., 2010). Las micobacterias enteras, lipoproteínas de micobacterias, lipoarabinomananos y lipomananos forman

parte del AFC e interactúan con TLR2, TLR4 y TLR6 en la especie murina (Quesniaux et al., 2004).

Las citoquinas producidas en respuesta a los PAMPs, a su vez, promueven las respuestas de los LTh y dirigen la respuesta inmune hacia los perfiles Th1 o Th2 dependiendo del producto microbiano. Algunos ejemplos de adyuvantes que actúan modulando los perfiles de respuesta son: LPS, *Propionobacterium acnes*, las islas de CpG de ADN microbiano, las saponinas.

3.2. Actualidad en el estudio de los adyuvantes

La selección de un adyuvante apropiado no solamente permite aumentar la respuesta inmune sino que también permite modular el isotipo de inmunoglobulina que se produce y también el tipo de perfil, Th1 o Th2. La polarización hacia el perfil Th2 se obtiene con sales de aluminio, en tanto que las endotoxinas bacterianas y sus derivados que inducen una respuesta de tipo Th1 (Stills y Stills, 2005, McKee et al., 2010).

El reclutamiento y la activación de macrófagos y CD inducidos por el uso de estos adyuvantes producen además secuelas de tipo inflamatorio. Por ejemplo, los macrófagos activados secretan citoquinas pro-inflamatorias que reclutan neutrófilos, basófilos y linfocitos, aumentan la permeabilidad vascular, causan destrucción de tejidos y producen reacciones sistémicas que incluyen fiebre e incremento en la producción de PFA por parte de los hepatocitos. Los efectos locales y sistémicos exagerados son secuelas indeseables que hacen que el uso de adyuvantes resulte en dolor y estrés para el animal. Por lo tanto, la elección del adyuvante y el antígeno de interés son cruciales para lograr aumentar la eficacia de las vacunas sin inducir efectos adversos.

En la Tabla 3 se muestran algunos de los adyuvantes más estudiados y su modo de acción.

Tabla 3: Adyuvantes y su modo de acción

Tipo de adyuvante	Composición	Modo de acción
Adyuvantes de liberación prolongada	Fosfato de aluminio Hidróxido de aluminio	Depósito de antígeno de liberación lenta
	Adyuvante de Freund incompleto (AFI)	Depósito de antígeno de liberación lenta
Adyuvantes microbianos	Corinebacterias anaerobias	Estimulador de macrófagos
	Bacilo Calmette-Guérin (BCG)	Estimulador de macrófagos
	Muramildipeptido	Estimulador de macrófagos
	<i>Bordetella pertussis</i>	Estimulador de linfocitos
	Lipopolosacárido (LPS)	Estimulador de macrófagos
Inmunoestimulantes	Saponina	Estimula el procesamiento antigénico
	Lisolectina	Estimula el procesamiento antigénico
	Detergentes plurónicos	Estimula el procesamiento antigénico
	Acemanano	Estimulador de macrófagos
	Glucanos	Estimulador de macrófagos
	Sulfato de dextrán	Estimulador de macrófagos
Adyuvantes mixtos	Adyuvante de Freund completo (AFC)	Depósito de antígeno de liberación lenta Estimulador de macrófagos

Fuente: Tizard, 2009

Las emulsiones compuestas de agua y aceite desarrolladas por Jules Freund (adyuvante de Freund) han sido y continúan siendo utilizadas en vacunas veterinarias (Makepeace et al., 2009). El AFI se ha utilizado en humanos hasta la identificación de efectos tóxicos en el sitio de inoculación. En veterinaria, la toxicidad se ha controlado con la utilización de aceites de alto grado de refinamiento y surfactantes purificados, como el "mannide monooleate". Este adyuvante posee poco efecto sobre la respuesta inmune celular tan importante para el control de la mayoría de las enfermedades infecciosas (Chang et al., 1998; Miller et al., 2005). El AFC está compuesto, además, por micobacterias inactivadas por calor y se ha utilizado ampliamente en investigación. El agregado de las bacterias produce una reacción de hipersensibilidad tardía y modula la respuesta inmune hacia un perfil de tipo Th1. El desarrollo de hipersensibilidad limita su uso en humanos y en las especies domésticas (Stills y Stills, 2005). Además, interfiere con el diagnóstico de tuberculosis al inducir reacciones positivas.

En la actualidad, hay pocos adyuvantes aprobados para uso clínico tanto en medicina humana como veterinaria. El más empleado, es el hidróxido de aluminio que, en Estados Unidos se ha utilizado por muchos años en vacunas desarrolladas para humanos (McKee et al., 2010). Este adyuvante aumenta la producción de anticuerpos pero tiene poco efecto sobre la inducción de respuestas de tipo Th1 o citotóxicas. Por lo que no es de elección en la producción de vacunas contra enfermedades que requieran de las respuestas celulares (por ejemplo tuberculosis, malaria, leishmaniasis, SIDA). La producción de vacunas efectivas contra microorganismos intracelulares requiere del estudio de nuevos adyuvantes que induzcan fuertes respuestas de tipo celular. En este campo se han identificado adyuvantes provenientes de bacterias, ISCOMS, emulsiones oleosas, saponinas y adyuvantes sintéticos. Sin embargo, de manera similar a lo descrito para el AFC, estos adyuvantes producen reacciones inflamatorias

en el sitio de inoculación, lo cual estimula la respuesta inmune innata y la activación de LT por parte de las CPA. Recientemente, se ha aprobado el uso de monofosforil lipido A para su uso en vacunas de Virus de Papiloma Humano en combinación con hidróxido de aluminio. En Europa, se usan otros adyuvantes compuestos de agua y aceite (MF59 producido por Novartis y ASO3 producido por Glaxo SmithKline). Así como esos ejemplos, se están desarrollando varios ensayos clínicos en humanos (Tabla 4) (McKee et al., 2010). También en bovinos, se han realizado estudios utilizando la incorporación de un adyuvante oleoso (Marcol 52, Arlacel C y Tween 80) a una vacuna de *Tritrichomonas*, con resultados alentadores ya que se detectó un incremento en la resistencia a la infección en los animales inmunizados con esta vacuna (Cobo et al., 2004; Riccio et al., 2008).

Tabla 4: Adyuvantes utilizados en humanos

Adyuvante	Composición	Actualidad
Sales de aluminio	Hidróxido de aluminio	En uso: DT, DPT, DBV, HiB, <i>Streptococcus pneumoniae</i> , meningocóccicas, HPV.
MF59	Emulsión aceite (escualeno) en agua	En uso en Europa: influenza. Ensayos para malaria, hepatitis C y HIV.
MPL	Derivado no tóxico de LPS	Ensayos combinado con MF59 para malaria y leishmaniasis o en forma de liposomas.
QS21	Fracción purificada de QuilA	Ensayo sólo o en combinación con MPL para malaria, influenza y cáncer.
ISCOMS	Liposomas conteniendo QS21	Ensayos en vacunas para influenza.
AS01	Liposomas conteniendo MPL y QS21	Ensayos para malaria.
AS02	Emulsión agua en aceite (escualeno) de MPL y QS21	Ensayos para malaria, HBV y TB.
AS03	Emulsión agua en aceite (escualeno)	Ensayos para influenza.
AS04	Hidróxido de aluminio y MPL	Ensayos para HBV y HPV.
MPL-SE	MPL en emulsión agua en aceite (escualeno)	Ensayos para leishmaniasis.

Abreviaturas: DPT, Difteria pertussis toxoide tetránico; DT, toxoide Difteria; HBV, Hepatitis B, HiB, Haemophilus influenzae; HIV, virus de inmunodeficiencia Humana; HPV, virus Papiloma Humano; ISCOMS, Complejos inmunoestimulantes; LPS, lipopolisacárido; MPL, monofosforil lípido A; TB, tuberculosis.

Fuente: McKee et al., 2010.

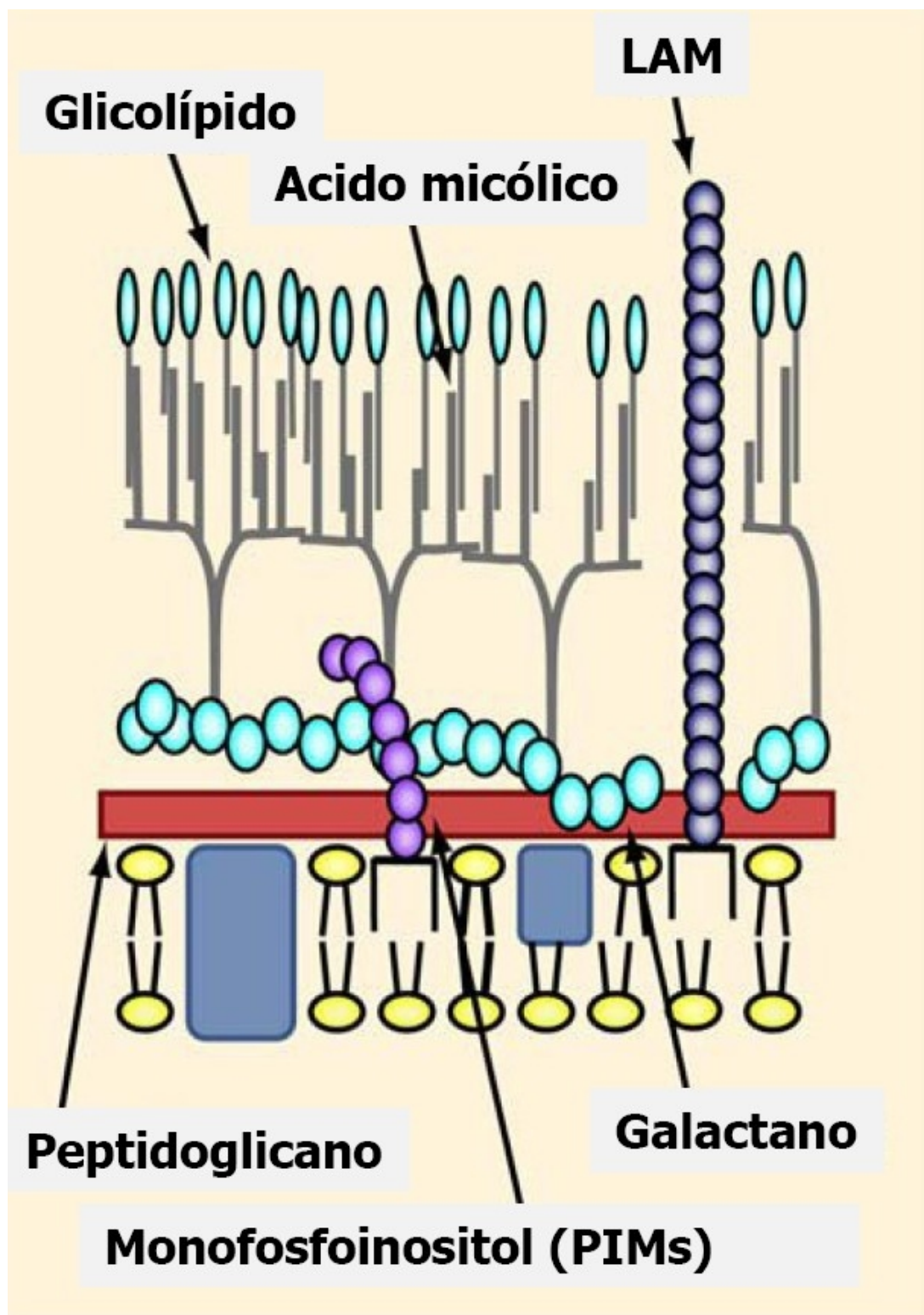
4. MICOBACTERIAS Y COMPONENTES DE LA PARED CELULAR

Las bacterias son microorganismos que pueden multiplicarse en el medio extra o intracelular. Su estructura se considera un mosaico antigénico dado que estimula múltiples respuestas en el sistema inmune del huésped. Dentro de las bacterias intracelulares, las micobacterias tienen una amplia capacidad para persistir dentro de las células del huésped, incluso en presencia del sistema inmune intacto.

Las micobacterias patógenas pueden sobrevivir y replicarse dentro del ambiente normalmente hostil de los macrófagos. La clave del comportamiento de las micobacterias patógenas es la estructura de su pared celular y sus interacciones con el sistema inmune. La pared celular está formada por lípidos, glicolípidos y proteínas (Briken, 2004, Pitarque et al., 2008) (Figura 4). Entre los glicolípidos (GL) presentes en la paredes celulares de micobacterias se describen el Lipoarabinomanano (LAM) y sus precursores, lipomananos (LMs) y monofosfoinositol manósidos (PIMs) (Nigou et al., 2003).

Los LMs y LAM se encuentran unidos de forma no covalente a la membrana plasmática de las micobacterias a través de su ancla de PIMs y se extienden hasta el exterior de la pared celular (Besra y Brennan, 1997; Nigou et al., 2003; Pitarque et al., 2008). Estas moléculas complejas juegan un papel muy importante en la fisiología de las bacterias así como también en la modulación de la respuesta inmune del huésped durante la infección.

Figura 4: Esquema de la pared celular de las micobacterias



Fuente: Akira et al., 2006.

4.1. Estructura de LAM y lipoglicanos relacionados de micobacterias

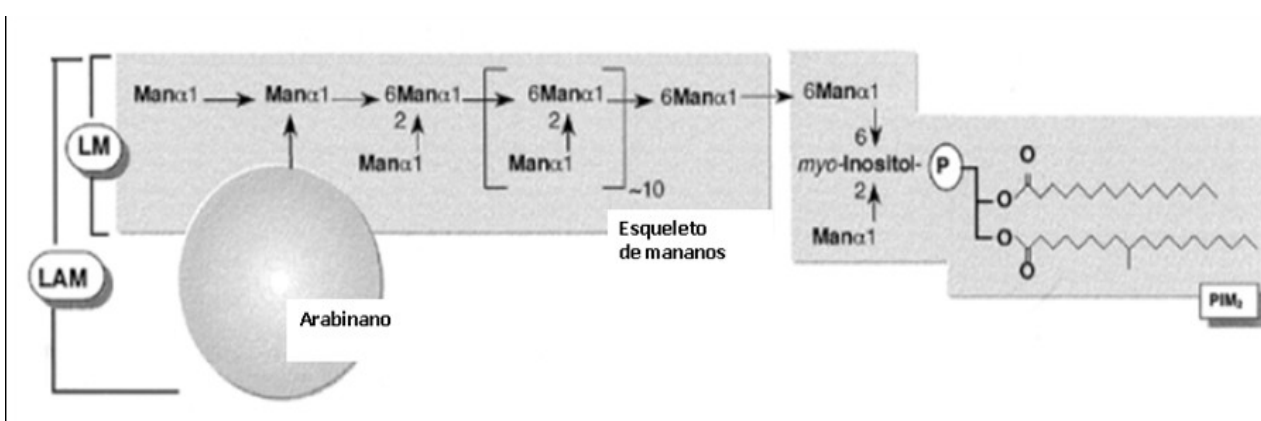
Los PIMs y sus contrapartes multiglicosiladas, LMs y LAMs son lipoglicanos complejos que se encuentran en forma ubicua en las paredes celulares de todas las especies de micobacterias. Tanto PIMs, LMs y LAMs conservan un ancla de fosfomonoinositol que les permite insertarse en la membrana plasmática (Hunter y Brennan, 1990), esto sugiere que están relacionados metabólicamente (Besra y Brennan, 1997). Además de los PIMs, los LAMs poseen un esqueleto de manosas con ramificaciones de polímeros de arabinosa y, en algunos casos, motivos de cubierta compuestos por cadenas cortas de manosas que decoran la región terminal de estas ramificaciones (Nigou et al., 2003) (Figura 5).

El esqueleto de manosas consiste en un polisacárido unido en Manopiranososa (Man ρ) α 1,6, que está sustituida en el carbono 2 por una única unidad de Man ρ en numerosas especies, incluyendo *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium kansasii* y *Mycobacterium smegmatis* y sustituida en el C3 por una única Man ρ en *Mycobacterium chelonae* (Guerardel et al., 2002). La medida y el grado de ramificación del esqueleto de manosas dependen de la especie. El polímero de arabinosa consiste de una cadena linear de α 1,5 arabinofuranosas (ara β) y puntos con ramificaciones de hexa-arabinofuranosidos (ARA $_6$) y cadenas cortas de 4 arabinosas (ARA $_4$) (Chatterjee et al., 1991; 1993).

El LAM se encuentra presente en las paredes celulares de micobacterias patógenas (*M. tuberculosis*, *M. leprae*, *M. bovis*, *M. avium* subsp. *paratuberculosis*) y oportunistas (*M. avium*, *M. kansasii*, *M. fortuitum*, *M. chelonae*, *M. smegmatis*). Además, se han encontrado en otros grupos de patógenos como *Rhodococcus equii*, *Rhodococcus ruber* (Garton et al., 2002; Gibson et al., 2003a), *Corynebacteria* (Sutcliffe, 1995) y *Amycolatopsis* (Gibson et al., 2003b).

El LAM se clasifica en ManLAM, PILAM y AraLAM de acuerdo a la estructura de la cubierta presente sobre los extremos no reductores de las cadenas de arabinosas. Se denomina ManLAM a las moléculas cuya cadena terminal de arabinosas están modificados con cubiertas compuestas de una sola Man α p, un dimanósido o un trimanósido, con predominio de dimanósidos y se encuentran en las cepas patógenas como *M. tuberculosis*, *M. leprae*, *M. avium* y *M. kansasii* (Nigou et al., 1997; Khoo et al., 2001; Guerardel et al., 2003). El ManLAM contiene alrededor de 50 unidades de Man α p y 60 Ara α f. En la Figura 5 se muestra la estructura propuesta para el ManLAM de *M. tuberculosis*. Los PILAMs tienen una cubierta de monofosfoinositol en las terminales arabinanos y se encuentran en especies no patogénicas de crecimiento rápido como *M. smegmatis*, *M. fortuitum* (Khoo et al., 1995). La tercer molécula designada AraLAM, se ha identificado en *M. chelonae*, y es una molécula de LAM sin las cubiertas de PIMs ni de manosas (Guerardel et al., 2002).

Figura 5: Modelo estructural de LAM de *M. tuberculosis*



4.2. Utilización de micobacterias y LAM como moduladores de la respuesta inmune

Numerosos grupos de investigadores describen los efectos adyuvantes y moduladores de las micobacterias induciendo la respuesta hacia un perfil Th1 cuando se agregan a vacunas.

Zuany-Amorin et al. (2002) demostraron que la infección de ratones con *M. vaccae*, inactivada por calor, reduce las manifestaciones asmáticas por la modulación hacia un perfil Th1. En el modelo murino de alergia a ovalbúmina (OVA), se ha demostrado que el tratamiento con Bacilo Calmette-Guerin (BCG) sólo o junto con LAM disminuye la eosinofilia y la producción de IL-5 también posiblemente por la modulación hacia un perfil Th1 (Racila y Kline, 2005; Sayers et al., 2004).

Ito et al. (2008) evaluaron el efecto del LAM de paredes celulares de *M. bovis* (BCG) en la diferenciación de LTCD4 humanos provenientes de sangre periférica. En ese estudio *in vitro*, se generó experimentalmente un microambiente inductor del perfil de tipo Th1 mediante el agregado de IL-12, IL-2 y Acs anti- IL-4 o de tipo Th2, mediante el agregado de IL-4, IL-2 y anti-IFN γ se demostró que la presencia de LAM inducía un perfil Th1 en ambas condiciones experimentales.

Los estudios de modulación por LAM se han realizado *in vitro* con células humanas y murinas o *in vivo* con ratones (Barrow et al., 1993; Sieling et al., 1995; Bhattacharjee et al., 2007; Smit et al., 2003; Sayers et al., 2004; Ito et al., 2008) utilizando diferentes dosis y protocolos de inmunización.

En bovinos se han utilizado extractos de paredes celulares de micobacterias como adyuvante junto con OVA demostrándose que su utilización induce una modulación hacia el perfil Th1. Esta formulación induce

además la reacción positiva en la prueba de intradermorreacción frente al derivado proteico purificado de *Mycobacterium bovis* (PPDb) utilizado para el diagnóstico de tuberculosis, lo que impide su utilización (Hernández et al., 2005).

La búsqueda de subproductos que induzcan una RI similar a la producida por el AFC pero que no interfieran en el diagnóstico de tuberculosis constituye un desafío para la formulación de vacunas más efectivas.

A la luz de los conocimientos previos, este trabajo propone evaluar el efecto de un componente de la pared bacteriana de las micobacterias, la molécula LAM, como potencial inmunomodulador en la especie bovina.

5. ¿POR QUÉ ELEGIR LA ESPECIE BOVINA?

La población mundial de bovinos es de aproximadamente 1,2 billones de los cuales el 70% se encuentra en países desarrollados. En la República Argentina la población de bovinos es de aproximadamente 49 millones (fuente: Ministerio de Agricultura, ganadería y pesca, 2010). La ganadería ha sido históricamente una actividad característica del país, ubicándose el sector ganadero en una posición fundamental dentro de la estructura económica. El ganado de mayor relevancia dentro del sector es el bovino, constituyendo su stock un 77% del total de la hacienda, mientras que el ganado ovino participa con un 19% y el porcino y equino con un 2% cada uno.

Las producciones de carne y leche en rumiantes constituyen los recursos de producción más económicos en el mundo, debido a que los rumiantes tienen la capacidad de convertir celulosa y hemicelulosa en energía y producir proteínas de alta calidad nutricional a partir de nitrógeno inorgánico. Esto puede ocurrir bajo condiciones extremas sobre suelos que no pueden ser utilizados para la producción de granos para la alimentación humana.

Esta investigación intenta aportar conocimiento sobre el efecto del LAM sobre la respuesta inmune en la especie bovina, tomando como antígeno a una proteína (antígeno T-dependiente), a fin de evaluar su potencial uso como adyuvante de vacunas que permitan aumentar el nivel de protección del ganado bovino frente a las enfermedades infecciosas más relevantes y, de esta manera contribuyan a mejorar el rendimiento de esta producción pecuaria.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS



6. HIPOTESIS

Las enfermedades infecciosas causan una pérdida económica alta en la producción de animales para consumo y las medidas preventivas, en general, no son suficientes. La vacunación es una de las principales prácticas que se utiliza para controlar las enfermedades infecciosas. Las vacunas comerciales, en su mayoría, inducen una respuesta inmune de perfil humoral. Uno de los desafíos actuales de los inmunólogos es encontrar nuevos adyuvantes que permitan prevenir enfermedades infecciosas induciendo no sólo la respuesta inmune humoral, predominantemente de tipo Th2, sino también encontrar adyuvantes que modulen las respuestas de tipo Th1. Dado que se ha demostrado previamente, en experimentos realizados *in vitro* en la especie humana y murina, que el LAM de micobacterias patógenas y no patógenas produce dicho efecto se postula que:

El LAM de la pared celular de micobacterias patógenas afecta la respuesta inmune frente a antígenos T dependientes en la especie bovina.

7. OBJETIVOS

7.1. Objetivo general:

Evaluar el efecto de la aplicación de ovalbúmina (OVA) junto con LAM y adyuvante de Freund incompleto (AFI) en la respuesta inmune celular y humoral de bovinos específica a OVA.

7.2. Objetivos particulares:

- ✓ Determinar el nivel de estallido respiratorio en células periféricas adherentes de bovinos inmunizados con OVA-AFI en combinación con LAM.
- ✓ Evaluar el aumento o disminución de la proliferación de células periféricas, la producción de IFN γ en sobrenadantes de cultivo y las subpoblaciones linfocitarias predominantes en bovinos inmunizados con OVA-AFI en combinación con LAM.
- ✓ Evaluar el aumento o disminución de la intradermorreacción en bovinos inmunizados con OVA-AFI en combinación con LAM.
- ✓ Evaluar los niveles de producción de Igs específicas e identificar el isotipo de Igs predominante en bovinos inmunizados con OVA-AFI en combinación con LAM.

MATERIALES Y MÉTODOS



8. CULTIVO DE MICOBACTERIAS

Como fuente de LAM se utilizó la cepa D4ER de *Mycobacterium avium* subsp. *avium* (Maa) ya que son bacterias del género *Mycobacterium* patógenas y por lo tanto poseen ManLAM en su pared celular. El crecimiento bacteriano se realizó en las instalaciones del Servicio Nacional de Sanidad Animal (SENASA) que cuenta con las condiciones de bioseguridad adecuadas, bajo la supervisión de la Dra. Amelia Bernardelli. Se utilizó el medio Dorset-Herley para el crecimiento de las micobacterias. Se incubó durante tres meses en estufa a 37°C (Figura 6). El cultivo completo se inactivó por calor (3 h a vapor fluente en autoclave) y se filtró para obtener el soma bacteriano. Se procedió a la liofilización del soma a fin de conservarlo hasta su uso.

Figura 6: Cultivo de Maa



9. EXTRACCIÓN DE LAM

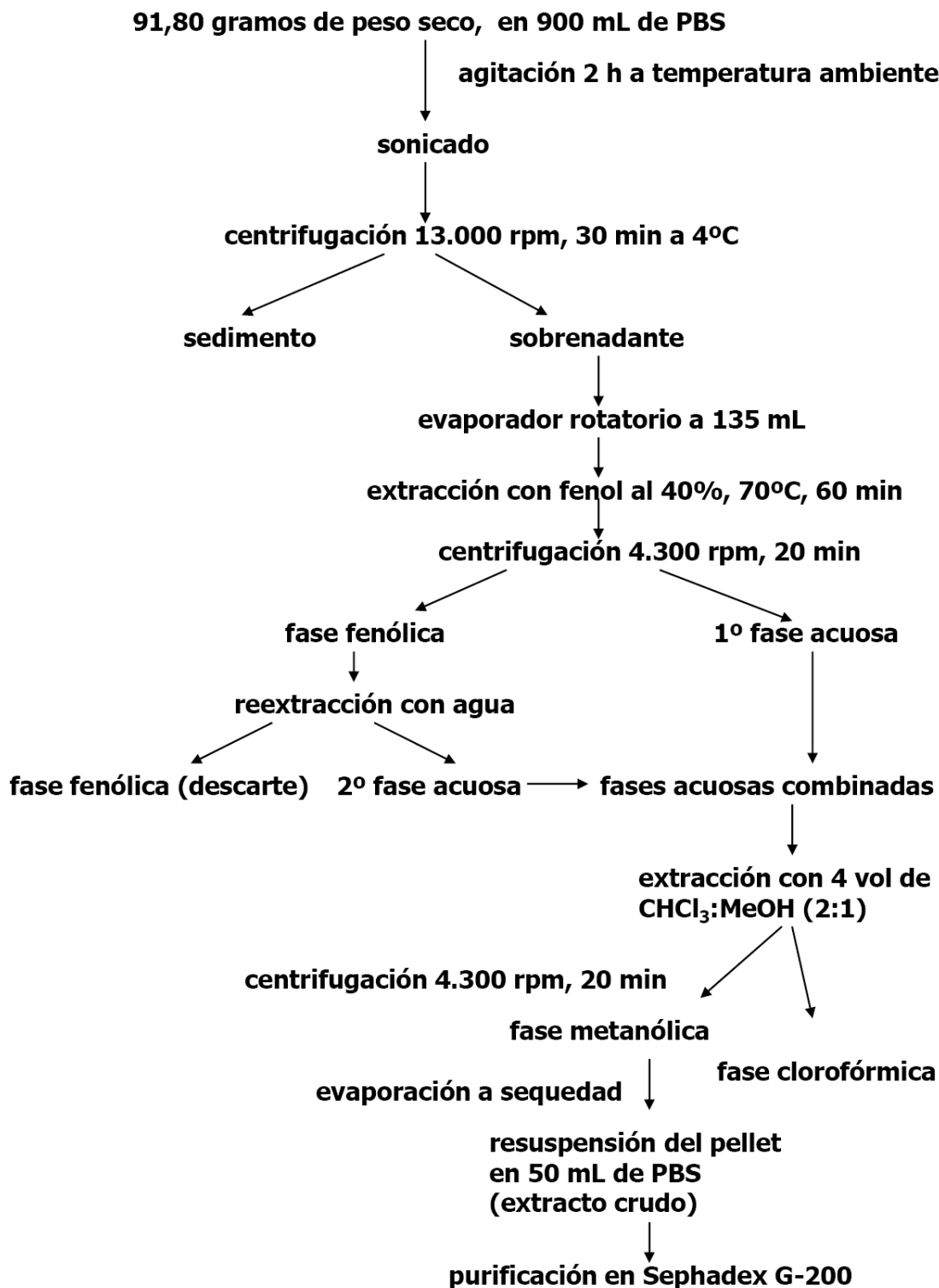
Se extrajo LAM utilizando el protocolo de Hamasur et al. (1999), a partir de las micobacterias liofilizadas. El esquema de extracción se muestra en la Figura 7. Las micobacterias (91,8 gr, peso seco) se resuspendieron en 900 mL de PBS estéril y se agitaron por 2 h con agitador magnético. Se sonicaron por 30 min a 60% de potencia (Hielscher, UP100H). Se centrifugaron a 13.000 rpm por 30 min a 4°C, para separar el sobrenadante, el que se concentró en evaporador rotatorio hasta llegar a un volumen de 135 mL.

Se agregó 1 volumen de fenol al 80% preparado en agua destilada (concentración final 40%) y se incubó por una hora a 70°C con agitación cada 5 min.

Se separó la fase acuosa (1º fase acuosa) de la fase fenólica por centrifugación a 4.300 rpm por 20 min. Se re-extrajo la fase fenólica remanente utilizando el mismo volumen de agua, se incubó 1 h a 70°C con agitación cada 5 min, y se centrifugó a 4.300 rpm por 20 min (2º fase acuosa).

Se extrajo la combinación de ambas fases acuosas con 4 volúmenes de cloroformo:metanol 2:1, se agitó y se centrifugó a 4.300 rpm por 20 min.

Se separaron las dos fases: la clorofórmica y la metanólica. Se evaporó a sequedad la fase metanólica y se resuspendió en 50 mL de PBS obteniéndose así la fracción denominada: extracto crudo.

Figura 7: Esquema de extracción de LAM

10. IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DEL EXTRACTO CRUDO

Se emplearon diferentes métodos para caracterizar el extracto crudo obtenido.

10.1. Determinación de azúcares por el método de Fenol-Sulfúrico

Se utilizó la técnica publicada por Dubois et al. (1956) para la determinación de azúcares. Se realizaron diferentes diluciones del extracto a medir. A 0,5 mL de cada dilución se agregaron 0,5 mL de fenol (Bio-Pack, Zárate, Bs As. Argentina) al 5%. Luego se colocaron 2,5 mL de ácido sulfúrico (Bio-Pack) directamente sobre la superficie de la solución. Se incubó por 10 min a temperatura ambiente (TA) y se midió absorbancia en espectrofotómetro a 490 nm (OpsysMR spectrophotometer, Dynex Technologies, Chantilly, VA. USA). Se utilizaron entre 0,5 µg/µL y 0,01 µg/µL de glucosa (Sigma Chemical Co. St. Louis, USA) para construir la curva patrón.

10.2. Determinación de proteínas

Se utilizó la técnica publicada por Bradford (1976) para la determinación de proteínas. Se realizaron diluciones del extracto y se incubaron 10 µL de cada una en placas de 96 hoyos fondo plano (GBO, Monroe, USA) a la que se le agregaron 40 µL de reactivo de Bradford (Bio-Rad, Hercules, Ca., USA). Se incubó por 10 min a TA y se midió absorbancia en espectrofotómetro a 595 nm (OpsysMR, Dynex Technologies). Se utilizaron entre 5 µg/µL y 1 µg/µL de albúmina bovina (Sigma Chemical Co.) para construir la curva patrón.

10.3. Control por electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE)

El extracto obtenido (extracto crudo) se controló mediante un SDS-PAGE al 12% (Laemmli, 1970) en el sistema de Mini-Protean[®] II cell (Bio-Rad). Se utilizó como patrón ManLAM de *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb, gentilmente cedido por el Dr. J. Belisle de la Universidad de Colorado, USA). Se sembraron en el gel 300 µg de hidratos de carbono por calle. Se realizó la corrida a 120 V por 1 h y se procedió a la tinción de hidratos de carbono y de proteínas.

10.4. Tinción de hidratos de carbono

Para evidenciar la presencia de hidratos de carbono se procedió a la incubación del gel obtenido en el punto anterior con una solución de ácido periódico al 0,2% a 40°C por 2 min (Tan y Grewal, 2002). Se realizó la tinción argéntica siguiendo el protocolo indicado en los reactivos comerciales (Bio-Rad, Silver Stain Plus), brevemente, se colocó el gel en la solución fijadora (20 mL de metanol, 5 mL de ácido acético y 25 mL de agua destilada) por 30 min, luego se lo colocó en la "solución oxidante" por 5 min, se realizaron 7 lavados con agua destilada. Se agregó el "reactivo de plata" por 20 min y se incubó con el "desarrollador de color" por 30 segundos hasta aparición de una coloración parda sobre las muestras de hidratos de carbono. Luego se frenó la reacción con ácido acético al 5% por 15 min.

10.5. Tinción de proteínas

Para la tinción de proteínas se utilizó coomassie brilliant blue (Sigma Chemical Co.) al 0,1% en metanol 100 mL, ácido acético 25 mL y agua destilada 125 mL. Brevemente, se colocó el gel en la solución colorante durante 2 h y se decoloró con varios pasajes del gel en la solución decolorante (metanol 100 mL, ácido acético 25 mL y agua destilada 125 mL)

hasta aparición de las bandas. El proceso de decoloración se frenó con agua destilada.

11. CARACTERIZACIÓN ANTIGÉNICA DEL EXTRACTO CRUDO

11.1. Evaluación de la antigenicidad del extracto crudo por ELISA

Para confirmar que el extracto contenía LAM, se empleó el anticuerpo monoclonal (AcMo) anti-ManLAM de Mtb (gentilmente cedido por el Dr. J. Belisle de la Universidad de Colorado, USA).

Las placas de ELISA (GBO) se sensibilizaron con 50 μ L de solución de 0,1 μ g de LAM/hoyo diluido en buffer carbonato 0,05 M pH 9,6 (buffer de pegado) e incubaron a 37°C por 1 h. Luego se realizaron 3 lavados con PBS conteniendo 0,05 % tween 20 (PBST). Posteriormente se incubó con PBST y 10% de leche descremada en polvo (buffer de bloqueo) por una hora a 37°C, se realizaron 3 lavados con PBST. Luego se agregó el AcMo anti-ManLAM diluido 1:500 en PBST y 5% de leche descremada (PBST-leche), se incubó 1 h a 37°C y se lavó 3 veces con PBST. Se utilizó como segundo anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa (KPL, Kirkegaard and Perry Laboratories, Gaithersburg, Ma, USA) diluido 1:1000 en PBST-leche. Se incubó por 1 h a 37°C y se lavó 3 veces con PBST. La reacción enzimática se desarrolló agregando 50 μ L de una solución de sustrato 0,1 mg/mL dihidrocloruro de *o*-fenilendiamina (OPD, Sigma Chemical Co.) en buffer citrato 0,1 M pH 5,00 (Sigma Chemical Co.) con el agregado de 10 μ L de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) 100 vol. La reacción enzimática se frenó con 50 μ L de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 1 N y se midió la densidad óptica (DO) en espectrofotómetro a una longitud de onda de 490 nm. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

11.2. Evaluación de la antigenicidad del extracto crudo por Western-blot

Se utilizó el mismo AcMo anti-ManLAM de Mtb empleado anteriormente en el ELISA (punto 11.1). Para ello se sembraron en un gel de poliacrilamida al 12% en condiciones desnaturalizantes, 300 μ g de hidratos de carbono/calle de LAM de Mtb y 300 μ g de hidratos de carbono/calle del extracto de Maa obtenido. Se lavó el gel con buffer de transferencia (3,03 g de Tris, 14,4 g de glicina y 200 mL de metanol para 1 L de solución) por 30 min y se transfirió a una membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad) a 120V por 1 h en agitación en buffer de transferencia. La membrana se lavó 3 veces con PBS durante 5 min cada una en agitación y se bloqueó con PBS con el agregado de leche descremada al 10% por 1 h a TA. Luego de 3 lavados de 5 min con PBS se agregó el AcMo anti-LAM (1:500) diluido en PBS, se incubó por 1 h a TA y se lavó nuevamente 3 veces durante 5 min cada una con PBS. Se incubó la membrana por 1 h a TA con un anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa (KPL) diluido 1:500 en PBS. Se realizaron 3 lavados de 5 min con buffer tris salino (TBS, 50 mM de tris.HCl pH 7.6; 150 mM de NaCl). Se utilizaron 0,5 mg/mL de diaminobencidina (DAB) (Bio-Rad) diluido en buffer TBS con el agregado de 10 μ L de H₂O₂ 30 vol como sustrato de la reacción enzimática. Luego de la aparición de las bandas de precipitación, se frenó la reacción con agua destilada.

12. PURIFICACIÓN DE LAM A PARTIR DEL EXTRACTO CRUDO

Una vez caracterizado el extracto crudo se procedió a la purificación utilizando una columna de Sephadex G-200 (Sigma Chemical Co, rango de separación de dextranos entre 1.000 y 100.000 kDa) de 1 m de largo por 2,5 cm de diámetro, a un flujo de 25 mL/h. Se lavó la resina varias veces con PBS y se calculó el volumen muerto (87,5 mL), a continuación se colocaron 50 mL del extracto crudo y se agregó PBS hasta la recolección del total del volumen de elución (155 mL). Para determinar la concentración de hidratos de carbono se utilizó la técnica de Fenol-Sulfúrico. Se obtuvieron 67 fracciones de 2,5 mL cada una.

12.1. Evaluación de la antigenicidad las fracciones obtenidas por ELISA

Todas las fracciones obtenidas (punto 12) se identificaron y caracterizaron según lo descrito anteriormente en los puntos 10 y 11. Se agruparon según su concentración de hidratos de carbono y antigenicidad obtenida por ELISA en 5 subfracciones denominadas: 1, 2, 3, 4 y 5. Las mismas se concentraron mediante ultrafiltración (Centricon YM, 10.000, Millipore, Billerica, Ma, USA) hasta obtener 5 mL por fracción siguiendo la técnica descrita por Hamasur et al. (1999).

13. DISEÑO EXPERIMENTAL

Se utilizaron 22 terneros criollos de entre 10 y 12 meses de edad (18 hembras y 4 machos) con un peso promedio de $189,6 \pm 32,4$ kg. Todos los animales provenían de campos libres de tuberculosis y brucelosis, se encontraban clínicamente sanos y no presentaron signos clínicos durante el transcurso de los experimentos.

Se realizaron tres inoculaciones a cada ternero por vía subcutánea en la región escapular izquierda a los días 0, 21 y 42. En la Figura 8 se muestra el esquema de inmunización.

Los animales se distribuyeron al azar en 4 grupos:

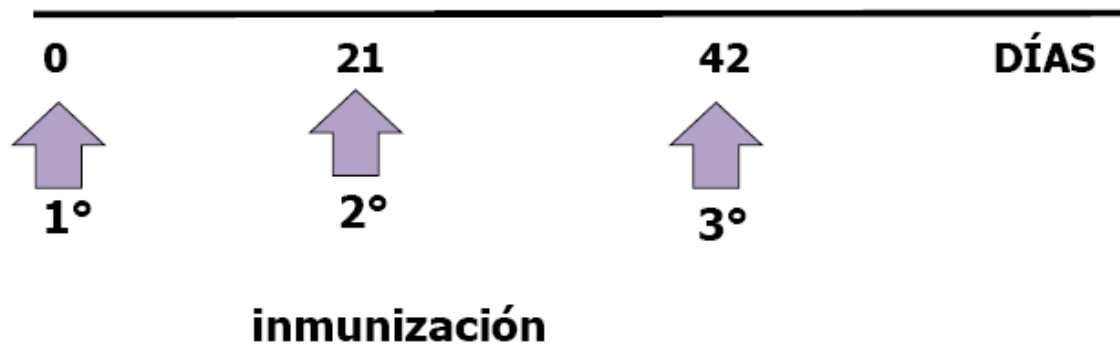
Grupo control de adyuvante (G-AFI): n=4, inmunizados con 1mL de PBS emulsionado con 1 mL de AFI.

Grupo LAM (G-LAM): n=2, inmunizados con LAM 1 mg/dosis diluido en 1 mL de PBS emulsionado con 1 mL de AFI.

Grupo OVA (G-OVA): n=7, inmunizados con OVA (1 mg/dosis; Sigma Chemical Co.) emulsionado con 1 mL de AFI.

Grupo OVALAM (G-OVALAM): n=8, inmunizados con OVA junto con LAM, emulsionado con 1 mL de AFI.

Control positivo de intradermorreacción (IDR, n=1), se inmunizó un animal con *Mycobacterium avium* subsp. *avium* inactivada por calor (Maai, 2 mg/dosis) emulsionado con 1 mL de AFI.

Figura 8: Esquema de inmunización

En la Figura 9 se muestra parte del rodeo utilizado para los experimentos.

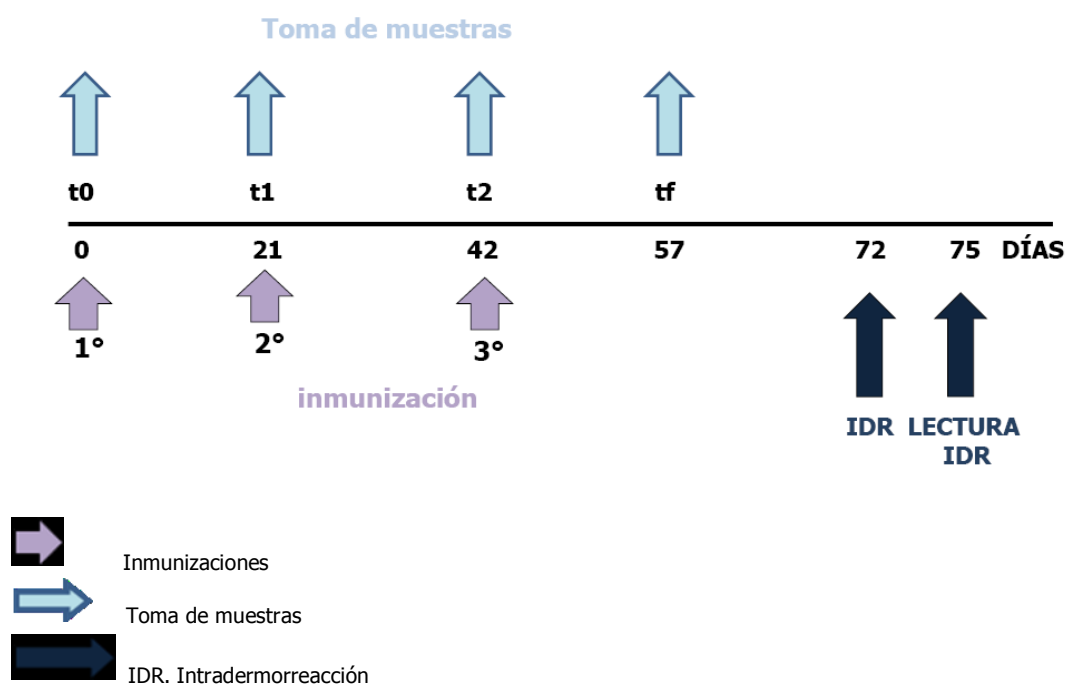
Figura 9: Terneros inmunizados (durante el período de experimentación)

14. TOMA DE MUESTRAS

Se extrajeron las muestras de sangre por punción de la vena yugular antes de cada inmunización y 15 días después de la última inmunización (Figura 10). Para extraer el suero, se recolectó la sangre sin anticoagulante, se incubó por 1 h a 37°C y 30 min a 4°C, se centrifugó a 3.000 rpm durante 30 min para separar el coágulo del suero. Los sueros de cada animal se fraccionaron y conservaron a -20°C hasta el momento de su utilización.

Se recolectó sangre con heparina, 15 UI (0,1mg) por mL de sangre para los ensayos de estallido respiratorio, sangre con EDTA (0,5 mL de solución al 1 % para 5 mL de sangre) para la fórmula leucocitaria y con ACD (1 volumen de ACD, ácido cítrico 0,9 g, citrato disódico 2 g, dextrosa 2 g en 120 mL de agua destilada, por cada 4 volúmenes de sangre) para la separación de células mononucleares (CMN) para cultivo y estudio de las subpoblaciones.

Figura 10: Toma de muestras



15. EVALUACIÓN GENERAL DE LOS ANIMALES E INOCUIDAD DEL TRATAMIENTO

15.1. Valores hematológicos

Se evaluaron los valores hematológicos de todos los animales utilizados en los experimentos a t0 y tf a fin de determinar si el tratamiento con LAM modificaba los valores normales.

15.2. Perfil de proteínas séricas

Para determinar si el LAM modificaba el patrón de proteínas séricas de los bovinos utilizados se realizaron corridas electroforéticas de todos los sueros antes (t0) y luego de la última inmunización (tf). Las corridas electroforéticas se realizaron a 150 V por 35 min en tiras de acetato de celulosa (Bio-Pack) y utilizando buffer veronal (Britania, Bs. As. Argentina). Luego se tiñó con coomassie brilliant blue (Sigma Chemical Co.) por 3 min y se decoloró tal como se describió en el punto 10.5. Luego se colocó en metanol por 30 segundos y 1 min en la solución transparentizante (8,5 mL de metanol y 1,5 mL de ácido acético). Se secó agitando sobre la llama y se procedió a la lectura por densitometría.

15.3. Niveles de anticuerpos específicos a la vacunación anti-aftosa

Para evaluar si el agregado de LAM modificaba la respuesta inmune humoral frente a virus de fiebre aftosa (VFA), se realizó un ELISA. Las placas se sensibilizaron con 470 µg/µL de una mezcla de sobrenadantes de cultivos de células BHK infectadas con VFA (cepas 01 campos, A24 cruzeiro, A Argentina 2001 y C3 indaial) inactivado. Producido por Laboratorios Paul (gentilmente cedido por el Médico Veterinario E. Frick). Se desarrolló la técnica de ELISA tal como se describió anteriormente (punto 11.1). Se utilizó

un anti-IgG bovino conjugado con peroxidasa (KPL) como anticuerpo secundario en una dilución de 1:1000.

15.4. Niveles de anticuerpos frente a *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Map) ELISA-PPA

Se utilizaron placas de 96 hoyos sensibilizadas con 2 µg de derivado proteico purificado (PPA, Allied Monitor Inc., Missouri, USA). Para evitar reacciones cruzadas con otras micobacterias, se pre-adsorbieron los sueros con *Mycobacterium phlei* inactivada por calor (cultivada en nuestro laboratorio). Se utilizó como segundo anticuerpo un anti-IgG bovino conjugado con peroxidasa (KPL) en una dilución de 1:1000.

Para poder clasificar los resultados como positivos o negativos para cada dilución se calculó el valor de corte (VC) utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{VC} = \text{promedio de las densidades ópticas (DO) de los sueros control negativo} + 2 \text{ desvíos estándar (DS)}$$

A partir de los resultados se clasificaron los sueros como: negativos, cuando correspondía a un valor menor al VC, sospechosos, cuando correspondía a valores mayores al VC y menores a 1,5, y positivos, cuando correspondía a un valor mayor a 1,5.

15.5. Cultivo de Map

Se tomó materia fecal por braceo rectal de todos los bovinos utilizados en el experimento y se cultivó durante 16 semanas a 37°C en medio Herrold con yema de huevo con y sin micobactina y piruvato con el fin de determinar la presencia de Map (OIE manual, 1996).

15.6. Control de leucosis bovina

Se determinó la presencia de anticuerpos específicos frente a leucosis por inmunodifusión para verificar que el rodeo se encontrara libre.

15.7. Control de la ganancia de peso

Para determinar si el crecimiento de los animales se modificaba con el agregado de LAM se estimó el peso de los animales utilizando una cinta bovométrica antes (t_0) y después del tratamiento (t_f). Se calculó la ganancia de peso de los animales ocurrido durante los 57 días que duraron los experimentos.

16. EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE INTERMEDIARIOS REACTIVOS DEL OXÍGENO

Para determinar la producción de intermediarios reactivos del oxígeno se utilizó una técnica que evalúa el nivel de estallido respiratorio en células adherentes obtenidas a partir de sangre periférica (Chung et al., 1993).

Para ello, se utilizó sangre con heparina que se centrifugó por 15 min a 2.000 rpm. Se obtuvo la capa de células blancas y se resuspendió en medio de cultivo (RPMI 1640, Sigma Co.). Se colocaron 100 μ L de células (1×10^6 /hoyo) en una placa de 96 hoyos fondo plano (GBO). Se agregaron 150 μ L de medio de cultivo, se incubó por 1 h a 37°C a fin de permitir la adherencia de las células, luego se lavaron las células con 200 μ L de PBS tibio, 3 veces. Las células adherentes se incubaron con 50 μ L de plasma bovino y se estimularon con *Saccharomyces cerevisiae* (15.500×10^6 /mL de levaduras resuspendidas en medio de cultivo), durante 1 h a 37°C. El estallido respiratorio se determinó por el agregado de 50 μ L de colorante azul de tetrazolio (NBT, Sigma Chemical Co.), que al oxidarse en presencia de intermediarios reactivos del oxígeno vira de color. La reacción se incubó por 1 h a 37°C y se frenó con 100 μ L de HCL 1 N, se lavó varias veces con 200 μ L de PBS y los cristales de NBT se solubilizaron con 150 μ L de dimetil sulfóxido (DMSO, Bio-pack) y 10 μ L de KOH 1 N. Se homogenizó con pipeta y se incubó a TA en oscuridad por 10 min, se midió la absorbancia a 550 nm.

17. EVALUACIÓN DE LA INMUNIDAD CELULAR

17.1. Linfoproliferación

Se separaron los linfocitos por medio de un gradiente de densidad utilizando Histopaque (Sigma Chemical Co.) a una densidad de 1.084. Para esto, se centrifugó la sangre con anticoagulante a 3.000 rpm por 30 min a TA. Se extrajo la capa de células blancas y se diluyó con PBS. La suspensión de leucocitos se agregó lentamente sobre 5 mL de Histopaque. Se centrifugó por 15 min a 3.000 rpm a TA. Se extrajo con pipeta el halo de células blancas (células mononucleares, CMN) y se lavó varias veces con PBS. Se realizó el recuento y determinación de la viabilidad de células mediante la tinción con azul tripán.

Se sembraron 500.000 céls/hoyo (100 μ L) en placas de cultivo de 96 hoyos fondo en U (GBO) en medio de cultivo adicionado con 2-mercaptoetanol y 10% de suero de feto bovino.

Se estimularon con el mitógeno inespecífico, Concanavalina A (Con A, Sigma Chemical Co.) 2,5 μ g/mL y antígeno específicos, 250 μ g/mL de OVA (Sigma Chemical Co.), 250 μ g/mL de LAM, y con 100 μ L medio de cultivo como control sin estimular. Se incubaron las células por 72 h a 37°C con 5% de CO₂ y 18 h previas a la finalización del cultivo se agregaron 20 μ L de timidina tritiada (100 μ Ci/mL, Methyl-3H-thymidine, New England Nuclear radiochemicals, Massachusetts, USA). Las células fueron cosechadas en papel Whatman GF/A y la radiactividad incorporada (cuentas por minuto, cpm) se midió en un contador de centelleo líquido (Beckman 1800 LS beta counter, Beckman Coulter, Inc. Brea, CA, USA) con tiempo de lectura de 180 min. Los resultados se expresaron como índice de estimulación (**IE**)

utilizando la siguiente fórmula: $IE = \frac{X \text{ cpm células estimuladas}}{X \text{ cpm células sin estimular}}$.

17.2. Determinación de la producción de IFN γ en sobrenadantes de cultivo

Para la determinación de la concentración de IFN γ en el sobrenadante de cultivo de las CMN cultivadas y estimuladas como se describió en el punto 17.1 a t₀ y a t_f, se realizó un ELISA (duoset ELISA development system, R&D Systems Inc, Minneapolis, USA). Se sensibilizaron placas de 96 hoyos (GBO) con 100 μ L de anticuerpo anti-IFN γ (R&D) 2 μ g/mL en PBS por 16 h a TA. Se lavaron las placas tres veces con PBST. Se bloquearon con 100 μ L de PBS conteniendo 0,05% Tween 20 y 0,05% de azida sódica. Se agregaron 100 μ L de los sobrenadantes de cultivo y se incubaron nuevamente por 2 h a TA. Se lavó la placa y se agregó 100 μ L de anti-IFN γ (R&D) marcado con biotina 400 ng/mL en PBS conteniendo 5% de Tween 20 incubándose por 2 h a TA. Luego de un nuevo proceso de lavado se agregaron 100 μ L de streptavidina peroxidasa (R&D) 1:200. Se reveló la placa como se describió anteriormente en el punto 11.1. Se utilizó IFN γ recombinante (R&D) para construir la curva patrón y realizar la cuantificación.

17.3. Determinación de subpoblaciones linfocitarias *in vivo* e *in vitro*

17.3.1. *In vivo*

Para identificar si el LAM modificaba las subpoblaciones periféricas se obtuvieron muestras de sangre utilizando como anticoagulante ACD a t₀ y t_f. Se identificaron las subpoblaciones IgG⁺ (LB), CD4⁺, CD8⁺ y CD25⁺. Los anticuerpos comerciales utilizados se muestran en la Tabla 5. Como control de isotipo se utilizó IgG1 de ratón (e-Bioscience, San Diego, Ca., USA) y

como anticuerpo secundario el conjugado anti-IgG de ratón conjugado con fluoresceína (KPL).

Las CMN periféricas obtenidas según los descripto en el punto 17.1 a una concentración de 1×10^6 céls/100 μ L diluidos en PBS con 5% suero de feto bovino (buffer FACS) fueron utilizadas en cada experimento. Los controles realizados para cada muestra fueron:

- control de auto fluorescencia (CMN)
- control de conjugado (CMN+anti-IgG de ratón FITC)
- control de isotipo (CMN+IgG1 de ratón+ anti- ratón FITC)

Tabla 5: Anticuerpos utilizados para la determinación de subpoblaciones por citometría de flujo

Especificidad	Anticuerpo	Isotipo
IgG⁺	Anti-IgG bovina producida en conejo FITC (Sigma Chemical Co.)	policlonal
CD4⁺	Anti-CD4 bovino (VMRD, Pullman, Wa., USA)	IgG1
CD8⁺	Anti-CD8 bovino (VMRD)	IgG1
CD25⁺	Anti-CD25 bovino (VMRD)	IgG1

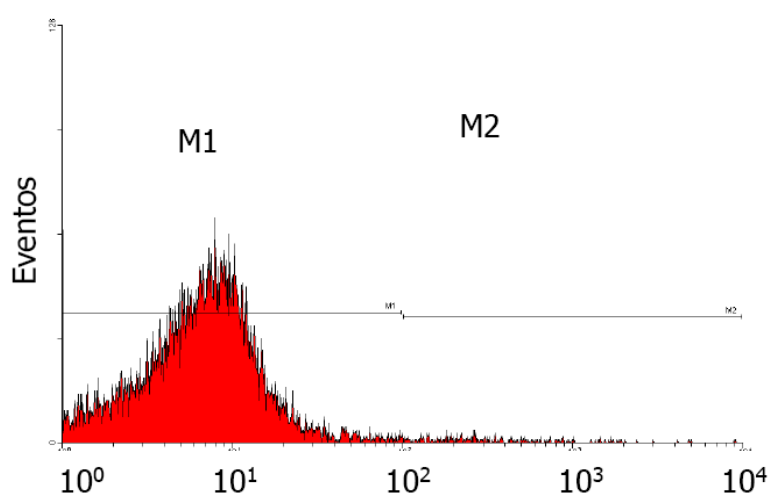
A cada alícuota de CMN se le agregaron 100 μ L de los anticuerpos primarios: Anti-CD4, Anti-CD8 y Anti-CD25 en una concentración de 1 μ g/mL y anti-IgG bovina conjugado con fluoresceína diluido 1:200. Se incubaron en hielo en oscuridad por 20 min. Posteriormente se centrifugaron a 2.000 rpm

por 2 min (2 veces) y se agregó paraformaldehído al 0,01% por 10 min. Se centrifugó nuevamente a 2.000 rpm por 2 min (2 veces), se descartó el sobrenadante y se agregó el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado con fluoresceína en una concentración de 10 µg/mL y se incubó por 20 min más en hielo y oscuridad. Se centrifugó a 2.000 rpm por 2 min (2 veces), se descartó el sobrenadante y se resuspendieron las muestras en 500 µL de buffer FACS.

Las células fueron analizadas con un citómetro de flujo con un laser de argón de 488 nm (FACScalibur, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) utilizando el programa CellQuest (Becton Dickinson). Se midieron 10.000 eventos/muestra.

Para determinar los eventos, se ubicaron las zonas del histograma en las que se detectaba marca en relación al control negativo de autofluorescencia (Figura 11). Los resultados se expresaron en porcentaje de células marcadas. En todos los casos se restó el control de isotipo.

Figura 11: Determinación de los parámetros a evaluar por citometría de flujo



M1: corresponde al sector de control negativo (autofluorescencia)
M2: corresponde al sector considerado como eventos positivos

17.3.2. *In vitro*

Para identificar las subpoblaciones linfocitarias presentes en los cultivos *in vitro* en los diferentes grupos de bovinos, se incubaron CMN con Con A, OVA y LAM. Se incubaron por 72 h a 37°C con 5% de CO₂ y posteriormente se marcaron las células con los anticuerpos específicos frente a las diferentes subpoblaciones linfocitarias (Tabla 5). Para ello se utilizó la misma metodología descrita para la identificación de las subpoblaciones linfocitarias *in vivo*.

17.4. Prueba de hipersensibilidad cutánea específica

Para determinar si el LAM modificaba la respuesta inmune producida *in vivo* se realizó una intradermorreacción (IDR) 30 días después de la tercera inmunización. Todos los animales inmunizados fueron inyectados intradérmicamente en la tabla izquierda del cuello usando una aguja Nº 28G. Previamente a la inyección, los sitios de inoculación fueron afeitados y desinfectados. Se inocularon 0,1 mL de PBS, 0,1mL de OVA a 1 mg/mL y 0,1 mL de PPD_b a 0,05 mg proteína/dosis (Centro Panamericano de Zoonosis, OPS). La respuesta a la IDR se determinó como la diferencia en el grosor (en milímetros) de la piel entre el momento de inyección y 72 h después. En la Figura 12 se muestra el procedimiento llevado a cabo durante la medición de la prueba. Se consideró como reacción positiva cuando la diferencia de grosor detectada fue mayor a 3 mm en grosor.

Figura 12: Intradermorreacción de un bovino del grupo G-OVALAM

a)



b)



a) Preparación de la zona de la tabla del cuello para la prueba de intradermorreacción. b) Medición con calibre del pliegue.

18. EVALUACIÓN DE LA INMUNIDAD HUMORAL

La respuesta humoral frente a OVA se evaluó mediante la determinación de anticuerpos específicos por la técnica de ELISA.

En todos los casos se realizó cada experimento por triplicado. Se determinó el título de anticuerpos específicos frente a OVA. Se consideró como título a la máxima dilución de suero que reaccionó en forma positiva.

18.1. Titulación de anticuerpos específicos contra OVA

Se sensibilizaron placas de 96 hoyos con 50 μ L de OVA (2,5 μ g/hoyo) en buffer de pegado. La técnica de ELISA se desarrolló tal como se describió en el punto 11.1. Se utilizó como anticuerpo secundario el anti-IgG bovino conjugado con peroxidasa (KPL) en una dilución de 1:1.000. Se titularon los sueros de los animales de los grupos G-AFI, G-OVA, G-LAM y G-OVALAM al día 0 (t0), a los 21 días (t1), a los 42 días (t2) y a los 57 días (tf).

18.2. Determinación de isotipos específicos contra a OVA

Para la determinación de isotipos específicos frente a OVA se realizó una prueba de ELISA utilizando una única dilución 1:1000. Se utilizaron anticuerpos que reconocen específicamente los diferentes isotipos bovinos (Tabla 6). Como anticuerpo secundario para el anti-IgG3 bovino se utilizó un anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa (KPL) en una dilución de 1:1000.

Tabla 6: Anticuerpos utilizados para el reconocimiento de los diferentes isotipos bovinos

Especificidad	Producido en	Conjugado con	Origen
Anti-IgM bovina	Oveja	Peroxidasa	Bethyl labs. Montgomery, Tx., USA
Anti-IgG1 bovina	Oveja	Peroxidasa	Bethyl labs.
Anti-IgG2 bovina	Oveja	Peroxidasa	Bethyl labs.
Anti-IgG3 bovina	Conejo	No conjugado	Elaborado por Mundo et al. (2008) en nuestro laboratorio.

19. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En el caso de la comparación entre animales del mismo grupo a t0 y luego de la tercera inmunización (tf) se analizaron los resultados utilizando el test de Student para muestras apareadas. Para la comparación entre los grupos se utilizó análisis de varianza (ANOVA). Para cada uno de los análisis estadísticos determinados por ANOVA se realizó el correspondiente pos-ANOVA (LSD).

Los resultados son presentados como promedio (X) \pm desvío estándar (DS). Los niveles de significación fueron fijados en un 5%. El análisis estadístico fue realizado mediante el software estadístico STATISTIX versión 8.0 (Analytical software, Tallahassee, USA).

RESULTADOS



20. EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LAM

20.1. Obtención del extracto crudo de LAM de Maa

La obtención del LAM se realizó por el método de Hamasur et al. (1999), a través de la extracción química de glicolípidos a partir del soma bacteriano de Maa. El rendimiento de la extracción en cada una de las fracciones obtenidas se determinó por la medición de hidratos de carbono (Técnica de Fenol-Sulfúrico), los resultados se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7: Rendimiento de la extracción de LAM

Muestra	Hidratos de carbono*		
	$\mu\text{g}/\mu\text{L}$	Gramos totales	Rendimiento %
Maa sonicadas (peso seco: 91,80 g)	93,70	84,30	100,00
Extracto crudo	266,57	13,30	15,70

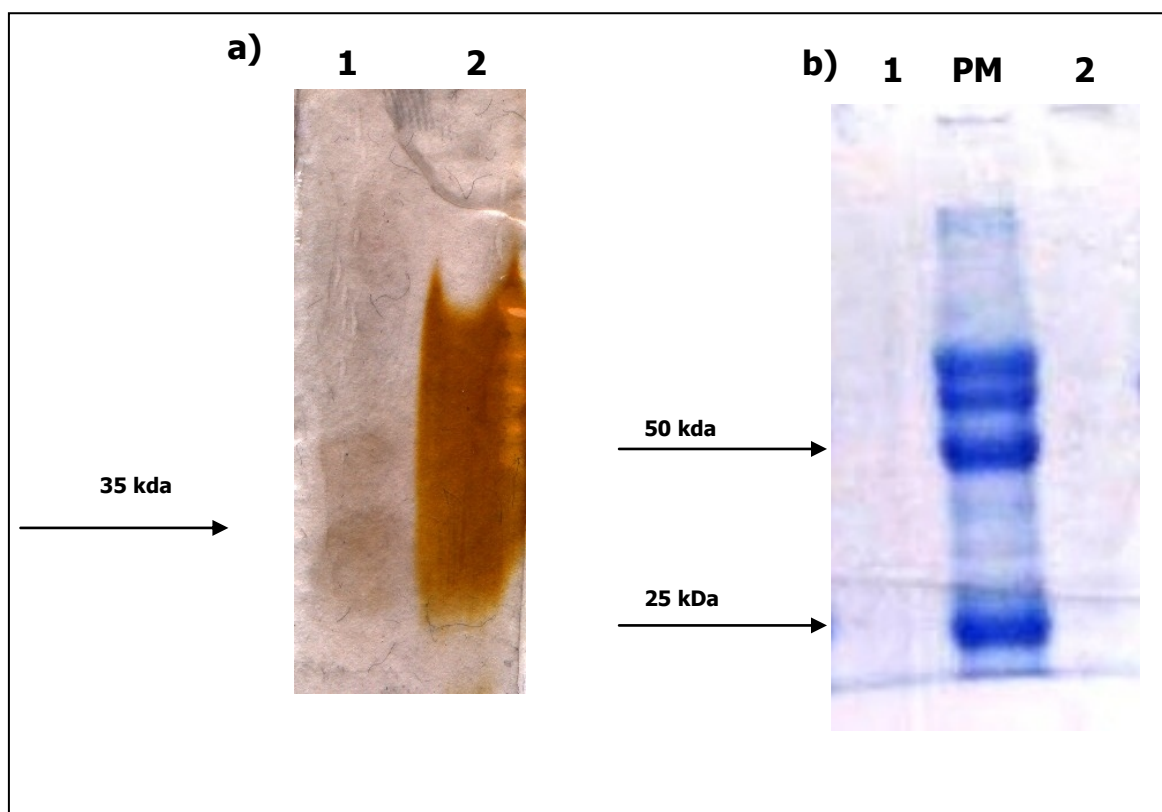
*Determinado por la técnica de Fenol-Sulfúrico (Dubois et al., 1956)

20.2. Identificación y caracterización del extracto crudo

Se realizó un SDS-PAGE con el objeto de comparar el peso molecular de las moléculas glicolípídicas extraídas con un LAM de referencia proveniente de Mtb. El extracto crudo obtenido migró en forma similar al LAM de referencia, detectándose una banda difusa alrededor de los 35 kDa (Figura 13a). A fin de controlar si aún se mantenían restos de proteínas en el extracto se realizó la tinción de coomassie (Figura 13b), mediante esta

metodología no se detectaron bandas en la calle correspondiente al extracto crudo, por lo tanto, podemos inferir que la concentración de proteínas fue menor de 0,1–0,5 μg , que corresponde al nivel mínimo de detección de esta técnica.

Figura 13: SDS-PAGE del extracto crudo



a) SDS-PAGE 12% revelado con tinción argéntica modificada para la coloración de hidratos de carbono

b) SDS-PAGE 12% revelado con coomassie brilliant blue.

Calle 1: Extracto crudo

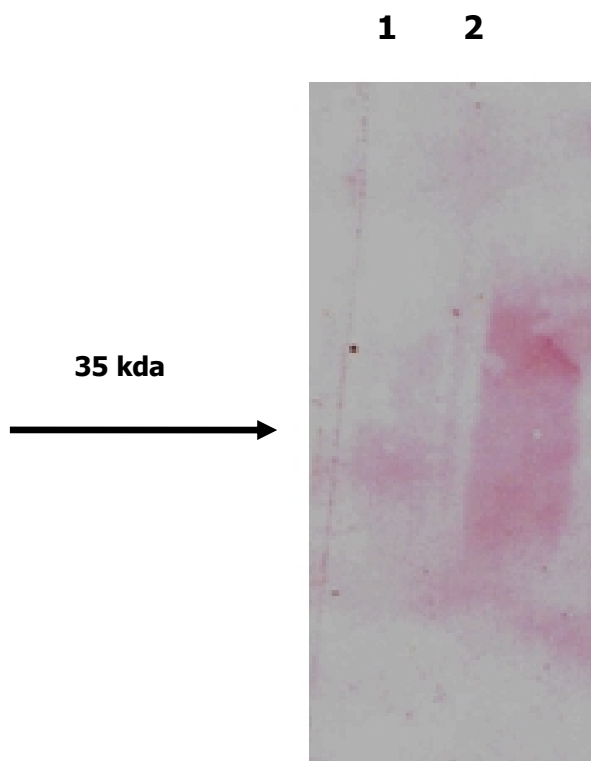
Calle 2: LAM de Mtb

PM: marcador de peso molecular

A fin de determinar si la extracción permitió conservar la antigenicidad, se realizó un western-blot utilizando como control el LAM de Mtb y un anticuerpo monoclonal (Ac Mo) anti-LAM de Mtb como anticuerpo primario.

En la Figura 14 se muestran los resultados obtenidos del western blot. Se detectó una banda difusa a la altura de 35 kDa similar a la obtenida para el LAM de referencia.

Figura 14: Western blot del extracto crudo



Calle 1: LAM Extracto crudo

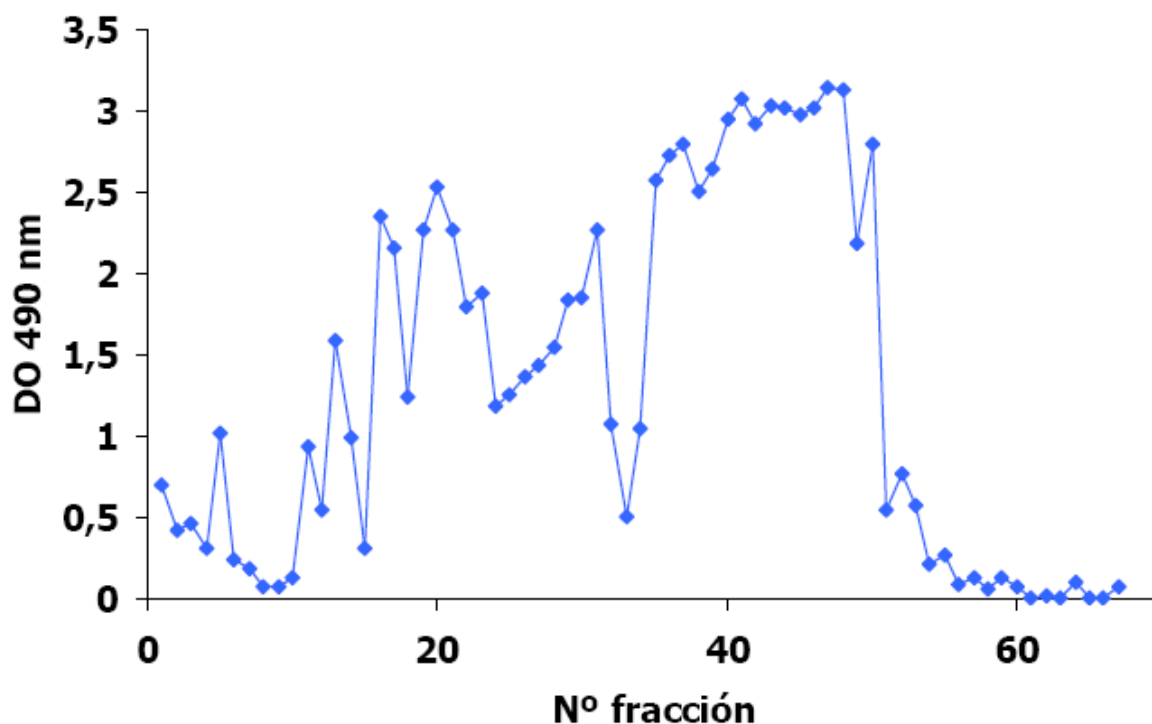
Calle 2: LAM de Mtb

20.3. Purificación de LAM de Maa

Luego de la obtención del extracto crudo se procedió a la purificación de LAM por cromatografía de exclusión molecular utilizando una columna de

Sephadex que permite una separación de dextranos de entre 1.000 y 100.000 kDa. De dicha separación se obtuvieron 67 fracciones que fueron evaluadas posteriormente por el método de Fenol-Sulfúrico para determinar la cantidad de hidratos de carbono presente en cada una de ellas (Figura 15).

Figura 15: Estimación de hidratos de carbono en cada una de las fracciones obtenidas luego de la purificación por columna de exclusión molecular

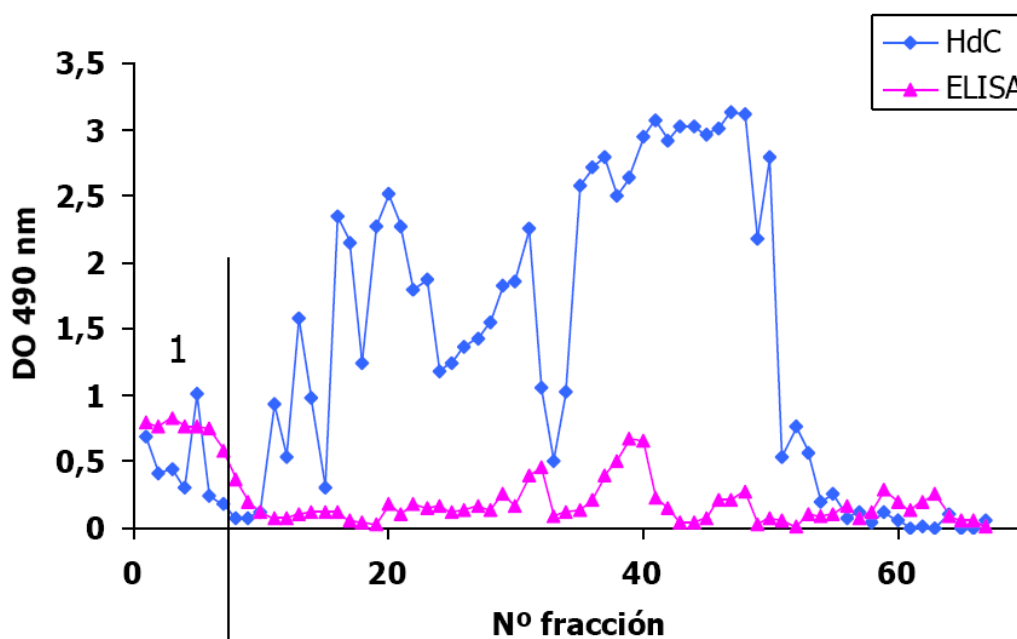


Los resultados se expresan en densidades ópticas obtenidas por la técnica de Fenol-Sulfúrico.

20.4. Caracterización antigénica del LAM purificado

Para determinar si la presencia de hidratos de carbono detectado en las diferentes fracciones purificadas correspondían a LAM en su estructura nativa se caracterizó la antigenicidad de las diferentes fracciones por ELISA utilizando el AcMo anti-LAM de Mtb. En la Figura 16 se muestran los resultados obtenidos por ELISA para cada una de las fracciones recuperadas de la purificación en superposición con la curva de estimación de hidratos de carbono graficada anteriormente (Figura 15).

Figura 16: Caracterización antigénica del LAM purificado utilizando anti-LAM de Mtb



HdC: hidratos de carbono determinados por la técnica de Fenol-Sulfúrico.
ELISA: utilizando el anti-LAM de Mtb.

En función del análisis conjunto de la caracterización de las fracciones por ELISA y Fenol-Sulfúrico se agruparon las fracciones en 5 tubos

denominados: 1, 2, 3, 4 y 5 en función de la concentración de hidratos de carbono y positividad en el ELISA. Las fracciones 1, 2 y 5 fueron agrupadas, concentradas y posteriormente caracterizadas nuevamente por Fenol-Sulfúrico y ELISA. Los resultados se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8: Caracterización de las fracciones obtenidas de la extracción y purificación de LAM

Muestra	Hidratos de carbono ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	Proteínas ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	Antigenicidad ELISA anti-LAM de Mtb (DO)
Maa enteras	53,90	0,47	ND
Maa sonicadas	93,70	6,50	0,08
Extracto crudo	266,57	0,27	0,28
Purificación con Sephadex			
1C (1-6) concentrado	201,20	0,04	0,82
1E (1-6)	46,17	0,07	0,22
2C (9-15) concentrado	110,00	0,11	0,16
2E (9-15)	5,80	0,09	0,02
5C (33-43) concentrado	5,07	1,06	0,05
5E (33-43)	46,17	0,26	0,02

ND: no determinado,

DO: indica densidad óptica 490nm determinada por ELISA

C: fracciones concentradas

E: remanente de las fracciones concentradas

La fracción 1C fue en la que se encontró mayor concentración de hidratos de carbono y además fue muy reactiva por ELISA.

En la Figura 17 se muestran los resultados obtenidos de la prueba de ELISA utilizando el anti-LAM de Mtb frente a cada una de las fracciones.

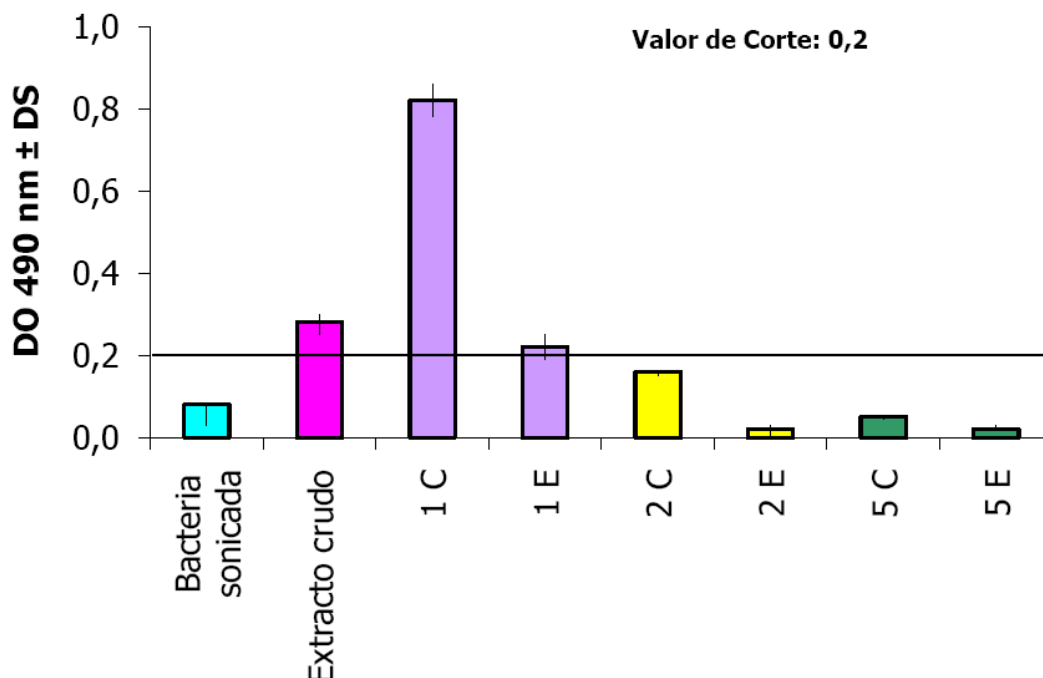
Los rendimientos obtenidos luego de la purificación se muestran en la Tabla 9.

Tabla 9: Rendimiento de la extracción y purificación de LAM

Hidratos de carbono*			
Muestra	µg/ µL	gramos totales	Rendimiento %
Maa sonicadas (peso seco: 91,80 g)	93,70	84,30	100,00
Extracto crudo	266,57	13,30	15,70
1C	201,20	3,03	3,5

*Determinado por la técnica de Fenol-Sulfúrico

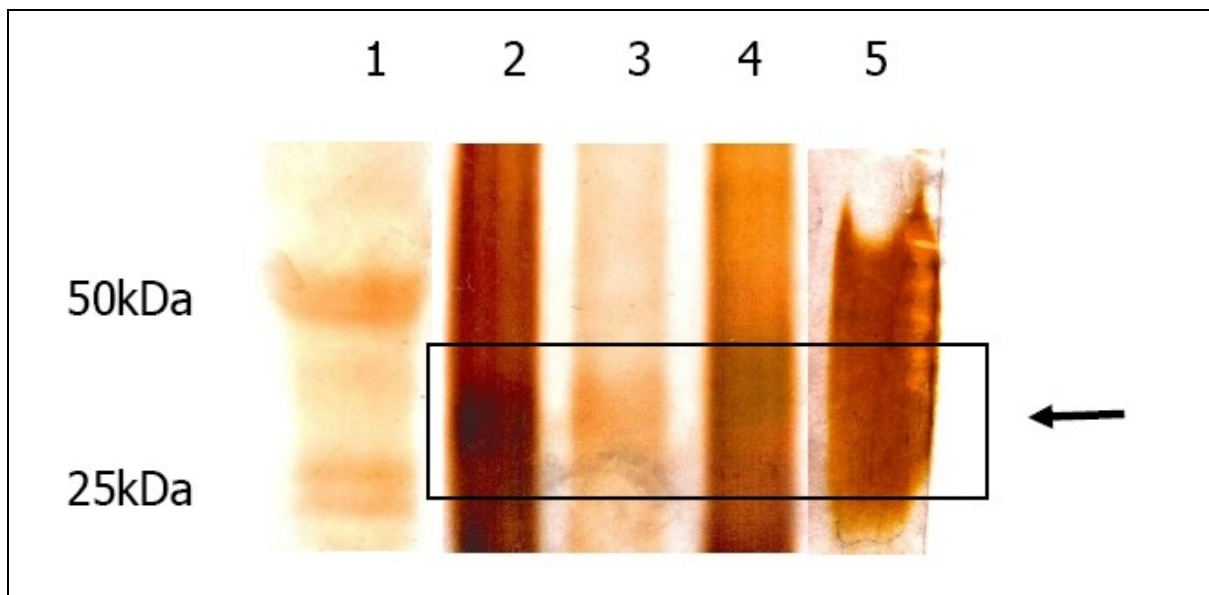
A partir de la fracción 1C se calculó el rendimiento de la extracción. Teniendo en cuenta que se partió de 91,8 g de bacterias sonicadas, se obtuvo un 3,5% de rendimiento calculado en función de los gramos totales de hidratos de carbono obtenidos para cada fracción por Fenol-Sulfúrico.

Figura 17: Antigenicidad de cada una de las fracciones obtenidas

Los resultados se expresan como densidades ópticas (DO) \pm desvío estándar (DS) obtenidas por la técnica de ELISA utilizando el AcMo anti-LAM de Mtb.

Luego de la determinación de antigenicidad de LAM por ELISA se identificó el peso molecular de la fracción más reactiva (1C) a través de un SDS-PAGE. El peso molecular obtenido se comparó con el patrón de LAM de Mtb y con el extracto crudo y coincidió con el peso molecular esperado para LAM. En la Figura 18 se muestra el resultado de la tinción para hidratos de carbono en cada una de las fracciones obtenidas utilizando SDS-PAGE.

Figura 18: Fracciones obtenidas de la extracción y purificación de LAM evaluadas por SDS-PAGE al 12% revelado por tinción argéntica modificada



1: marcador de peso molecular

2: Maa

3: 1C (concentrado)

4: Extracto crudo

5: LAM de Mtb.

El recuadro muestra la fracción de entre 25 y 40 kDa correspondiente al PM esperado de la fracción LAM.

De acuerdo a la metodología empleada para la extracción y la caracterización antigénica obtenida para la fracción 1C, esta fue denominada LAM y se utilizó para la preparación de los inmunógenos

21. EVALUACIÓN GENERAL DE LOS ANIMALES E INOCUIDAD DEL TRATAMIENTO

21.1. Evaluación de valores hematológicos

Se midieron los valores hematológicos (hemograma, índices hematimétricos y fórmula absoluta) para determinar si se identificaban variaciones luego de la inmunización.

En la Tabla 10 se muestran los resultados obtenidos para t0 y tf respectivamente.

Tabla 10: Valores hematológicos y fórmula leucocitaria absoluta obtenidos a partir de suero de los bovinos utilizados a tiempo 0 (t0) y a tiempo final (tf)

	G-AFI (n=5)		G-OVA (n=7)		G-LAM (n=2)		G-OVALAM (n=8)	
	t0	tf	t0	tf	t0	tf	t0	tf
Hemograma								
Hematocrito %	28,6±4,4	25,7±5,8	26±3,2	29±1,2	22,8±1,2	25,0±0,0	28,3±5,3	24,4±2,9
Glóbulos rojos mm³ (X10⁵)	60,6±10,1	51,2±8,0	55±3,3	57,9±2,4	48,9±24,9	48,9±4,4	63,6±6,4	51,1±7,3
Glóbulos blancos mm³ (X10³)	7,9±2,5	4,8±1,1	6,3±1,3	4,7±1,3	5,9±2,3	4,3±0,3	7,2±1,9	5,4±1,1
Hb. %	9,4±1,6	8,1±1,6	8,7±1,0	9,4±0,4	7,6±3,9	7,8±0	9,5±1,6	7,9±1,1
Recuento de plaquetas mm³ (X10⁵)	2,2±0,3	5,4±1,1	2,0±0,6	6,6±9,3	3,9±2,0	6,9±1,6	3,5±2,1	5,9±6,6
Índices hematimétricos								
Vol. corp. medio fI	47,3±3,8	49,7±4,0	46,9±4,9	50,1±2,2	37,4±21,4	51,3±4,6	44,3±5,5	47,9±2,7
Hb. corp. media %	15,5±1,2	15,8±0,9	15,8±1,4	16,2±0,9	12,4± 6,6	16,0±1,4	14,8±1,4	15,5±0,5
Conc. Hb. Corp media g/dl	32,8±0,6	31,9±1,2	33,8±1,3	32,4±1,2	26,8±14,0	31,2±0	33,6±2,0	32,4±1,7
Fórmula absoluta mm³								
Neutrófilos segmentados	3468,3±1707,1	3642,7±2446,8	2811,2±807,4	3972,0±753,0	2623,4±1261,7	1177,5±74,2	3311±1582	2930,5±526,8
Eosinófilos	72,7±125,9	186,7±62,3	69±80,1	249,3±139,2	118,3±33,3	63,5±26,2	114,4±77,3	203,5±124,7
Linfocitos	3647,5±1269,0	2888,0±1349,2	3696±375,7	5598,7±2399,8	3089,9±1260,1	2907,5±343,0	3510±1195,6	3831,0±932,7
Monocitos	277,7±193,9	216,0±110,0	348,8±96,94	380,0±81,7	227,1±91,7	151,5±40,3	365,6±238,7	285,0±158,7

Los resultados se expresan como promedio ± DS.

Cuando se analizaron los resultados obtenidos antes y después del tratamiento con LAM no se detectaron diferencias significativas entre los grupos analizados por ANOVA. Sólo se detectaron algunas leves modificaciones dentro de los grupos cuando se compararon antes y después de la inmunización utilizando la prueba t para muestras apareadas. Se encontró una disminución en el recuento de glóbulos rojos en el grupo G-AFI luego de la inmunización. En el porcentaje de neutrófilos segmentados se vio un aumento en los animales del G-OVA y una disminución en los animales del G-LAM, la combinación de OVA y LAM no produjo modificaciones en su concentración antes y después del tratamiento.

Con respecto a los linfocitos, sólo se detectó un aumento en los grupos luego de haber sido inmunizados con OVA, no así, en los grupos que no la recibieron. Los eosinófilos se vieron disminuidos en el G-LAM pero cuando se utilizó LAM y OVA en conjunto dicha disminución no fue detectada sino que además, se produjo un aumento en los animales de los grupos G-OVA y G-OVALAM. Es de destacar que todas las modificaciones detectadas en los valores hematológicos evaluados se hallaron dentro de los valores normales esperados para esta especie.

21.2. Perfil de proteínas séricas

Se realizó el proteinograma de cada uno de los animales utilizados para los experimentos a t0 y tf a fin de determinar si el agregado de LAM modificaba el perfil de proteínas séricas.

Los resultados se muestran en la Tabla 11 y en la Figura 19.

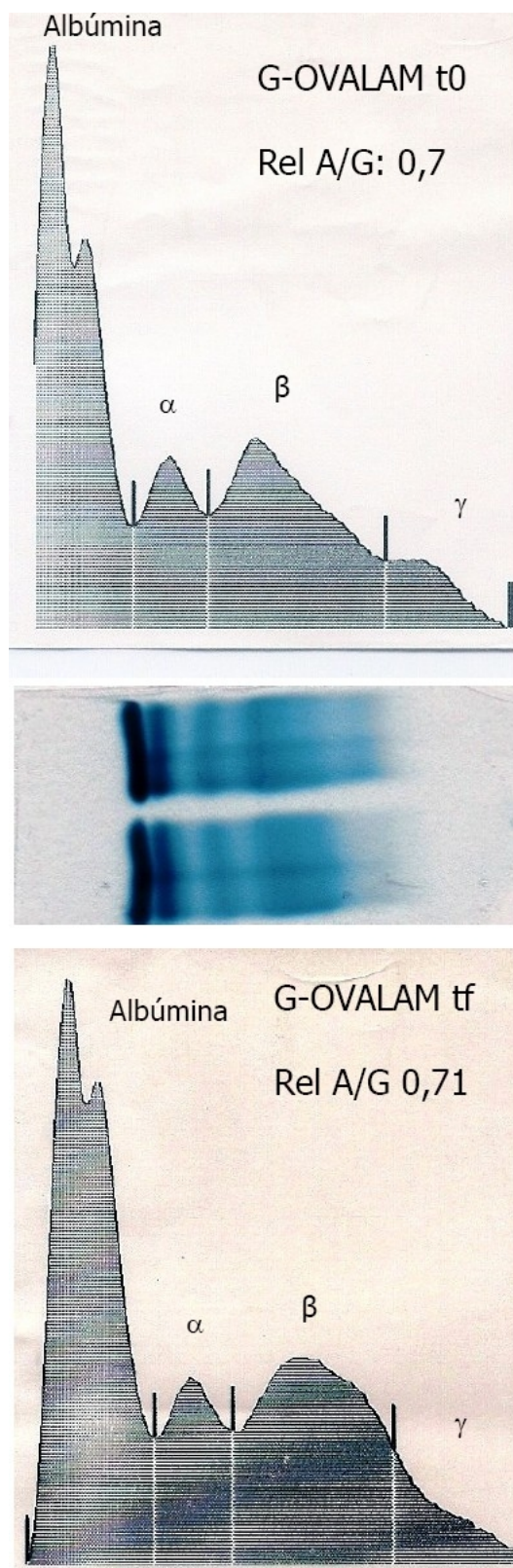
Tabla 11: Proteinograma obtenido de los bovinos a tf

	Proteínas totales	Albúmina	Alfa	Beta	Gamma	Relación A/G*
G-AFI	4,90±0,80	4,71±0,20	1,39±0,10	3,16±0,10	7,30±0,01	0,89±0,01
G-OVA	5,03±0,70	4,57±6,00	1,67±2,40	1,93±6,80	10,70±2,10	0,90±0,20
G-OVALAM	5,20±0,90	4,29±0,20	1,36±3,70	2,89±6,40	8,40±5,70	0,70±0,02

Los resultados se expresan en g/dL como promedio ± DS.

* relación A/G: relación albúmina/globulina

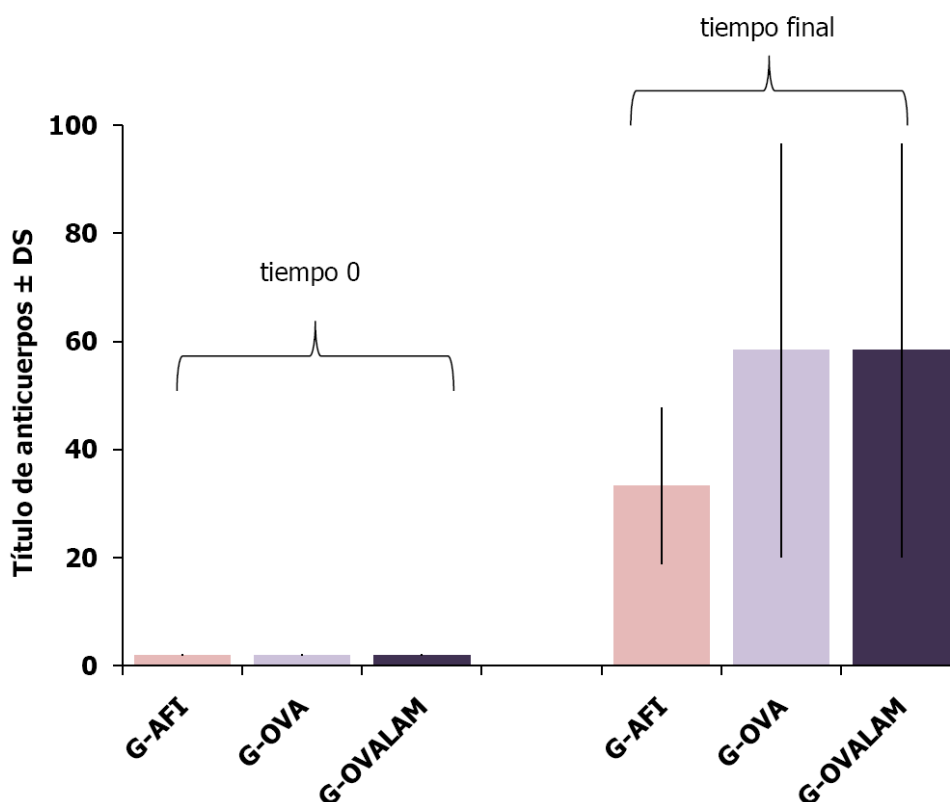
Figura 19: Electroforesis sérica de un bovino perteneciente al grupo G-OVALAM a t0 y tf



Los patrones obtenidos resultaron ser similares en todos los sueros analizados sin encontrarse diferencias significativas, entre los grupos G-OVA y G-OVALAM antes y después de la última inmunización. El análisis por t de Student para muestras apareadas fue de $p=0,51$ para el grupo G-OVA y $p=0,84$ para el grupo G-OVALAM. Cuando se realizó la comparación entre grupos por ANOVA a t_f para la relación albúmina/globulina (A/G) tampoco se detectaron diferencias ($p=0,83$).

21.3. Control de la producción de anticuerpos anti-aftosa inducidos por vacunación

Dado que los bovinos fueron vacunados contra el VFA simultáneamente con la primera dosis de inmunización, se analizaron los títulos de anticuerpos frente a VFA por ELISA. En la Figura 20 se muestran los resultados obtenidos por ELISA.

Figura 20: Título de anticuerpos específicos frente a VFA

Los resultados se expresan como título de anticuerpos \pm desvío estándar (DS)

En todos los grupos se detectó un aumento en el título de anticuerpos luego de la inmunización con la vacuna de VFA. Los niveles de anticuerpos frente a VFA no se modificaron con el tratamiento con LAM y las diferencias entre los diferentes grupos de animales no resultó ser significativa ($p=0,3$).

21.4. Evaluación de anticuerpos frente a Map, cultivo de materia fecal y anticuerpos frente a virus de leucosis bovina

En la Tabla 12 se muestran los resultados obtenidos por ELISA-PPA. En todos los casos los sueros resultaron ser negativos antes (t0) y luego de la inmunización (tf).

La realización de los cultivos de materia fecal, con el objeto de identificar la presencia de micobacterias resultó ser negativa antes y después tratamiento, así como también la evaluación de la presencia de anticuerpos específicos frente al virus de la leucosis bovina.

Tabla 12: Anticuerpos específicos frente a PPA determinados por ELISA

Grupo	tiempo 0	tiempo final
G-AFI	0,19±0,03	0,18±0,04
G-OVA	0,16±0,08	0,13±0,03
G-LAM	0,18±0,08	0,14±0,02
G-OVALAM	0,20±0,14	0,17±0,12

Los resultados se expresan como DO 490nm ± DS. El valor de corte se calculó a partir de 5 sueros probadamente negativos (VC= 0,35). El valor de referencia para un suero bovino infectado utilizado como control positivo fue de 1,04.

21.5. Efecto sobre el crecimiento corporal

Se determinó el peso de los bovinos inmunizados durante los experimentos para establecer si la inmunización con antígenos solos o con LAM modificaba la ganancia normal de peso de los animales pertenecientes a un rodeo de cría. En todos los casos se detectaron aumentos de peso en los animales independientemente de la inmunización que hayan recibido (Tabla 13). Cuando se comparó el aumento de peso registrado durante los experimentos realizados al final del tratamiento para los cuatro grupos, no se detectaron diferencias significativas ($p=0,18$) entre grupos. El aumento de peso fue similar para todos los bovinos utilizados.

Tabla 13: Ganancia de peso de los terneros

Ganancia de peso (Kg) en 57 días promedio \pm DS	
G-AFI	31,00 \pm 10,40
G-OVA	20,00 \pm 8,80
G-LAM	27,00 \pm 2,70
G-OVALAM	19,70 \pm 10,60

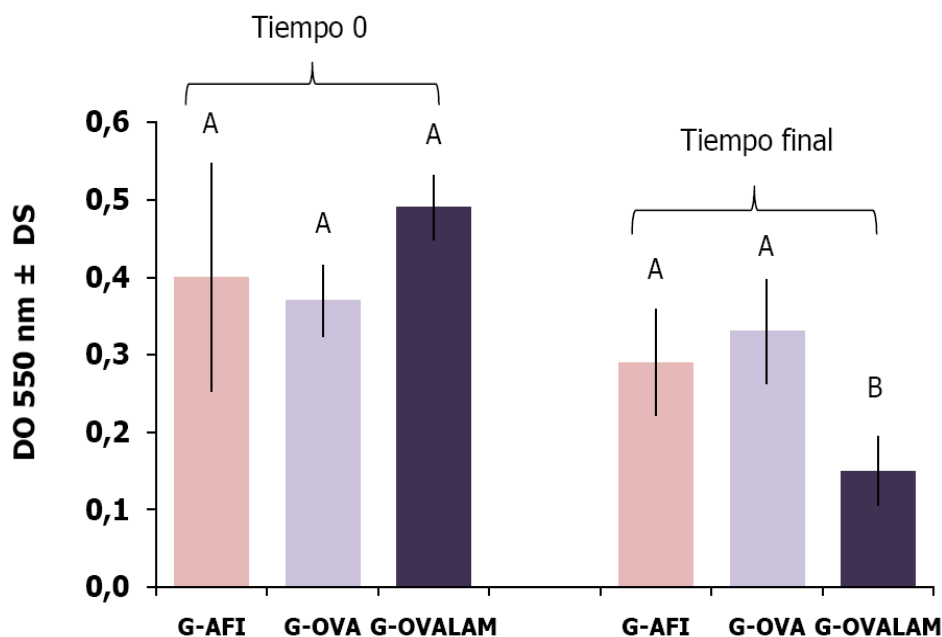
Los resultados se expresan como incremento de peso en kilogramos luego de concluido el plan de inmunización (57 días, tf) \pm desvío estándar (DS).

22. EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE INTERMEDIARIOS REACTIVOS DEL OXÍGENO

Para determinar cómo afectaba la utilización de LAM a la producción de intermediarios reactivos del oxígeno se utilizó la técnica de NBT que evalúa el estallido respiratorio. Los niveles determinados por el cambio de color y cuantificados por DO se midieron antes de la 1ª inmunización (t0) y al día 57 (tf).

En la Figura 21 se muestran las DO obtenidas a t0 y a tf.

Figura 21: Niveles de estallido respiratorio de células periféricas adherentes



Los resultados se expresan como promedios de densidad óptica obtenida (DO) a 550 nm \pm desvío estándar (DS). Las letras A y B indican las diferencias detectadas por el post-ANOVA (LSD) realizado a t0 y tf comparando entre grupos. $p < 0,05$.

Los niveles de estallido respiratorio que se detectaron en los diferentes grupos de animales a t0 fueron similares: G-AFI, G-OVA y G-OVALAM ($p=0,14$). La evaluación del estallido respiratorio a tf mostró que la producción de intermediarios reactivos de oxígeno en los animales del grupo G-OVALAM era menor que la producida por los animales pertenecientes a los grupos G-OVA y G-AFI ($p=0,03$) y que a los valores previos a la inmunización, evaluados por la prueba t de Student para diferencias apareadas comparado con el grupo G-OVALAM a t0 ($p=0,02$).

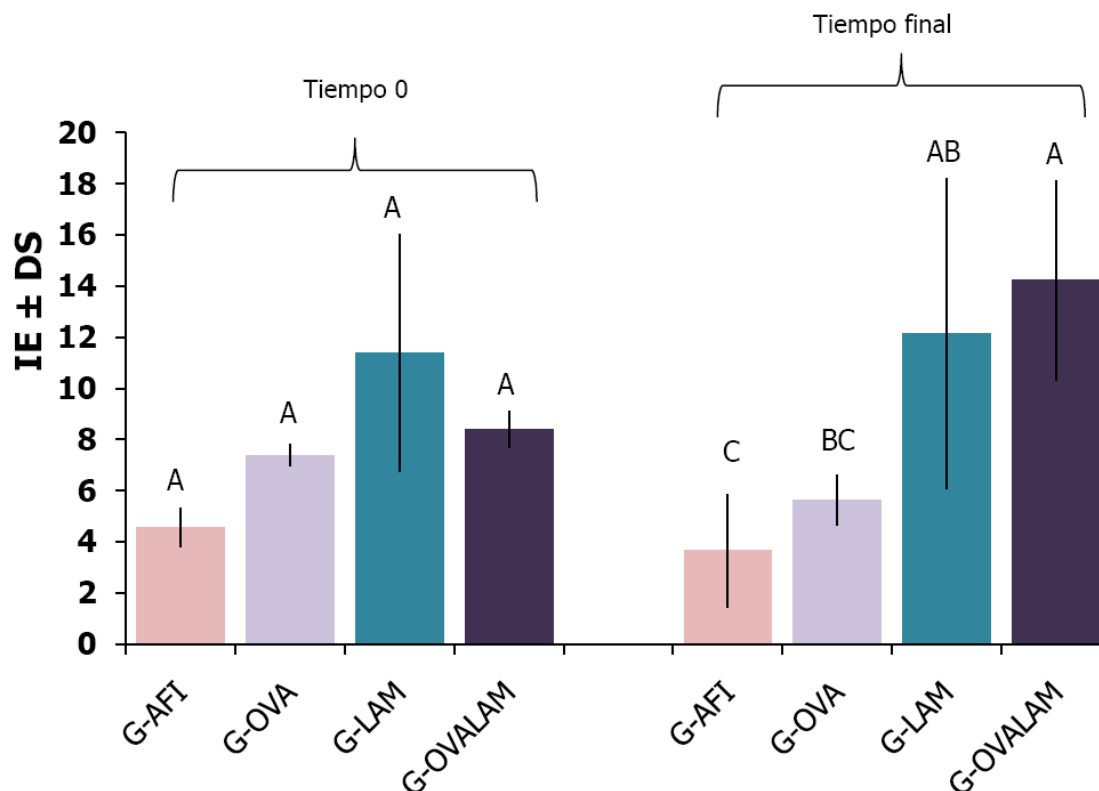
23. EVALUACION DE LA RESPUESTA INMUNE CELULAR

23.1. Efectos en la proliferación de CMN

Se realizaron ensayos de proliferación a partir de CMN periféricas de los bovinos pertenecientes a los grupos de estudio. Para ello las CMN se estimularon con ConA como mitógeno inespecífico y con los antígenos OVA y LAM.

En las Figuras 22 y 23 y en la Tabla 14 se muestran los resultados.

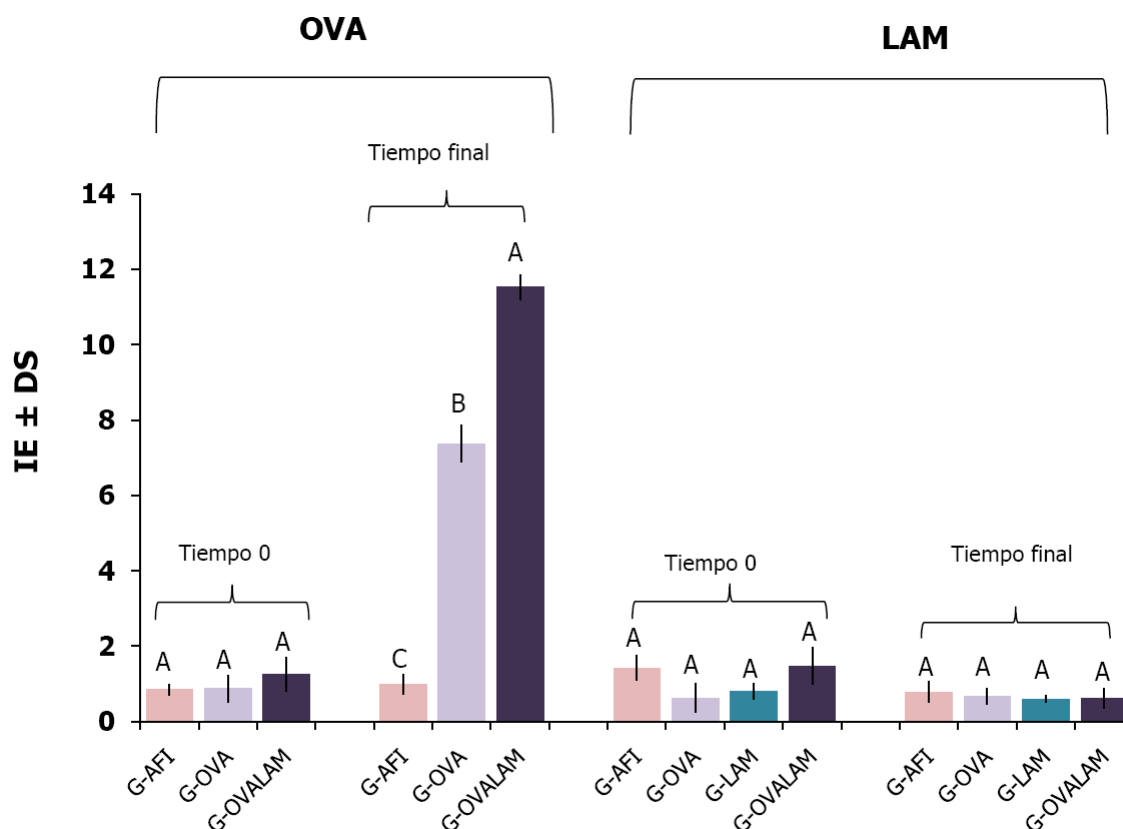
Figura 22: Efecto de LAM en la respuesta linfoproliferativa de CMN estimuladas con ConA



Los resultados se expresan como índice de estimulación (IE) \pm desvío estándar (DS). Las letras A, B y C indican las diferencias detectadas por el post-ANOVA (LSD) realizado a t0 y tf comparando entre grupos. $p < 0,05$.

Cuando las CMN se estimularon con ConA se detectó una mayor proliferación en los animales tratados con LAM (G-OVALAM y G-LAM) arrojando valores similares entre ellos, respecto de los grupos G-OVA y G-AFI. Con la prueba T para muestras apareadas se detectó un aumento significativo en el IE obtenido a t0 y tf para el grupo G-OVALAM ($p=0,04$), dicho aumento no fue detectado para el grupo G-OVA ($p=0,21$).

Figura 23: Efecto de LAM en la respuesta linfoproliferativa de CMN estimuladas con OVA y LAM



Los resultados se expresan como índice de estimulación (IE) \pm desvío estándar (DS). Las letras A, B y C indican las diferencias detectadas por el post-ANOVA (LSD) realizado a t0 y tf comparando entre grupos para cada tratamiento. $p < 0,05$.

Se detectó un aumento significativo en la proliferación de las CMN de los bovinos inmunizados a tf, tanto con OVA como con OVALAM cuando se estimularon con OVA. La comparación de los IE frente al estímulo OVA obtenidos a t0 y tf analizada por la prueba T de Student para muestras apareadas mostró diferencias significativas en los animales pertenecientes a los grupos G-OVA y G-OVALAM ($p = 0,002$, $p = 0,003$ respectivamente). La comparación entre grupos a tf mostró diferencias significativas entre los

grupos analizados siendo el grupo G-OVALAM el que mayor proliferación mostró luego de la inmunización ($p=0,001$, Figura 23).

El control con LAM como estímulo arrojó resultados negativos para todos los grupos y no se encontraron diferencias significativas entre los ellos ($p=0,77$, Figura 23). A fin de determinar si el extracto obtenido no afectaba la viabilidad de las CMN de la especie bovina a la concentración utilizada como estímulo *in Vitro*, el efecto citotóxico del LAM fue evaluado realizando experimentos de doble estímulo (ConA y LAM). Se incubaron CMN con ConA sólo y con el agregado de LAM y no se detectaron diferencias en el IE de cada variable (datos no mostrados), esto nos permitió confirmar que el LAM no poseía efectos citotóxicos.

Tabla 14: Respuesta proliferativa frente a mitógenos y antígenos específicos de los diferentes grupos de animales a *tf* utilizando CMN

Grupo	IE (promedio \pm desvío estándar)		
	ConA $p=0,009$	OVA $p=0,0001$	LAM $p=0,77$
G-AFI	3,60 \pm 2,19 C	0,98 \pm 0,26 C	0,78 \pm 0,27 A
G-OVA	5,64 \pm 0,98 BC	7,37 \pm 0,01 B	0,66 \pm 0,21 A
G-LAM	12,15 \pm 6,07 AB	ND*	0,62 \pm 0,26 A
G-OVALAM	14,22 \pm 3,90 A	11,52 \pm 0,35 A	0,61 \pm 0,07 A

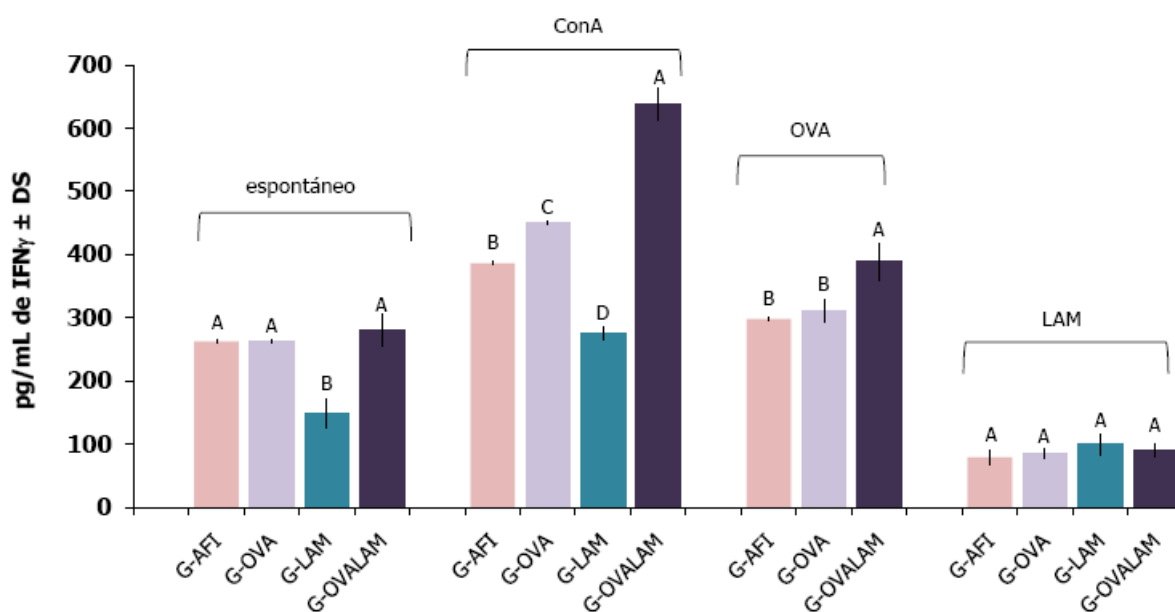
*ND: indica no determinado. Los resultados se expresan como índice de estimulación (IE) \pm desvío estándar (DS). Las letras A, B y C indican las diferencias detectadas por el post-ANOVA (LSD). Los valores de p corresponden a los análisis de varianza (ANOVA) realizados a *tf* comparando entre grupos para cada tratamiento.

23.2. Efecto sobre la producción de $\text{IFN}\gamma$

Otra forma de evaluar el estímulo de la respuesta inmune celular es la cuantificación de la producción de las citoquinas características del perfil Th1, como el $\text{IFN}\gamma$ producido por las CMN estimuladas con ConA, OVA y LAM. Se cuantificaron los niveles de $\text{IFN}\gamma$ en sobrenadantes de los cultivos de CMN.

En la Figura 24 se muestran los valores en picogramos por mililitro (pg/mL) obtenidos a t_f para cada uno de los grupos de animales evaluados.

Figura 24: Detección de $\text{IFN}\gamma$ en el sobrenadante de cultivo



Los resultados se expresan como picogramos por mililitro (pg/mL) \pm desvío estándar (DS). Las letras A, B, C y D indican las diferencias detectadas por el post-ANOVA (LSD) realizado a t_f comparando entre grupos para cada tratamiento. $p < 0,05$.

Los niveles de $\text{IFN}\gamma$ que se detectaron en los diferentes grupos de animales a t_0 fueron similares, menores a 100 pg/mL, sin detectarse diferencias significativas entre los grupos: G-AFI, G-OVA, G-LAM y G-OVALAM.

Cuando se evaluaron los sobrenadantes de cultivos obtenidos a t_f se detectó una disminución en la producción espontánea de $\text{IFN}\gamma$ en el grupo inmunizado con LAM (G-LAM) comparado con los otros grupos de animales ($p=0,01$). Un patrón de respuesta similar se detectó cuando se estimularon las CMN con ConA. Aunque en este caso también se detectaron diferencias entre los grupos experimentales (G-OVA y G-OVALAM) arrojando en éste último los valores más altos de todos los experimentos (mayores a 600 pg/mL).

Cuando se evaluó la producción de $\text{IFN}\gamma$ inducida por el antígeno específico (OVA) se detectó la misma tendencia que para ConA, obteniéndose mayor producción de $\text{IFN}\gamma$ en el grupo G-OVALAM comparado con G-OVA y G-AFI ($p=0,03$).

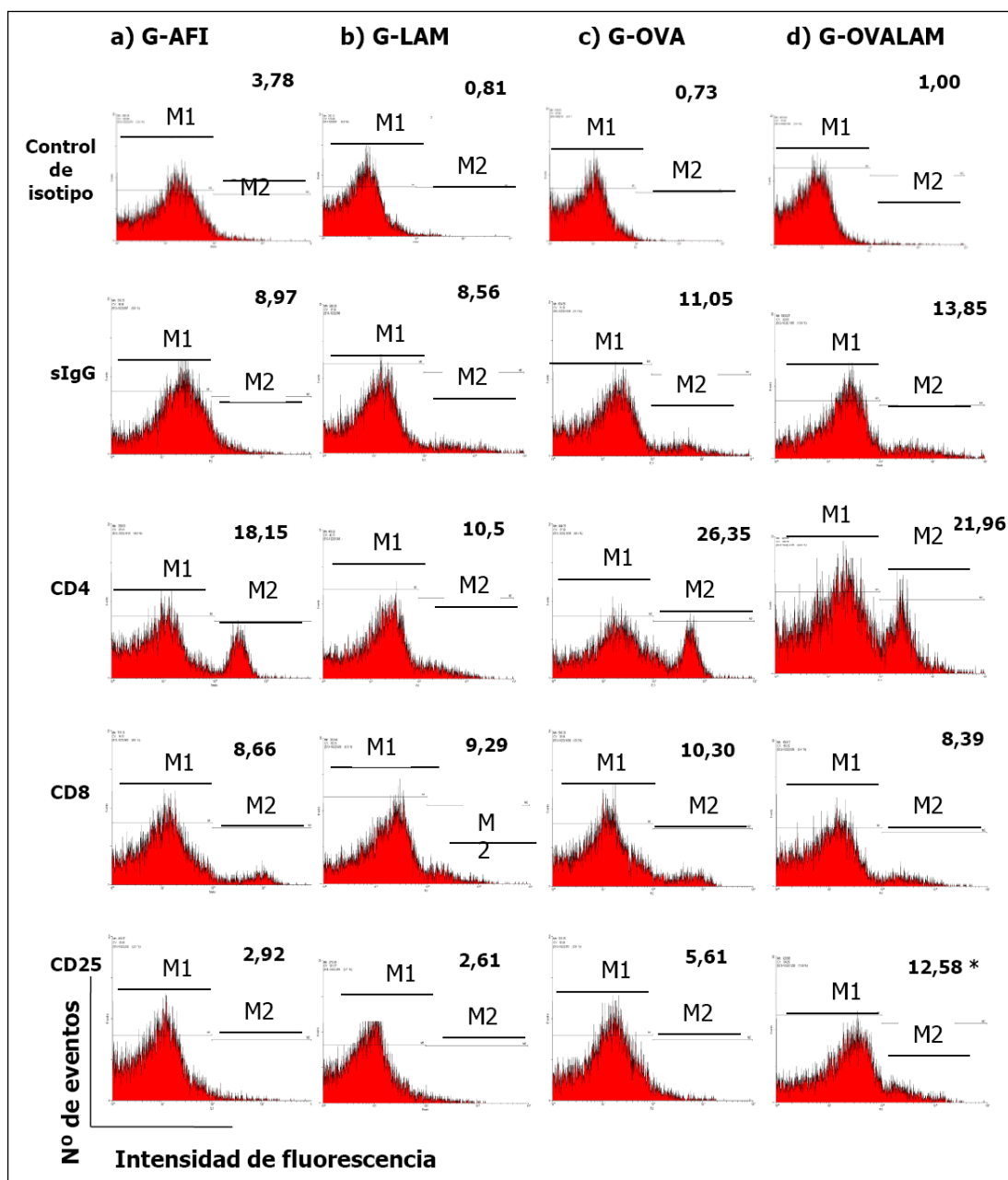
Cuando se estimularon las CMN con LAM se detectó una inhibición en todos los grupos ($p= 0,003$) en relación al control sin estimular (espontáneo) obteniéndose valores similares a los obtenidos a t_0 (Figura 24).

23.3. Efecto sobre las subpoblaciones linfocitarias periféricas

Se realizó la identificación del porcentaje de células que expresaban diferentes marcadores mediante citometría de flujo. Se analizaron las subpoblaciones linfocitarias presentes en sangre periférica de los terneros inmunizados a t_0 y t_f . Se identificaron los siguientes marcadores: Igs de superficie, CD4, CD8 y CD25.

En la Figura 25 se muestran los histogramas representativos de la expresión de IgG, CD4, CD8 y CD25 en células obtenidas de un animal representativo de cada uno de los grupos al día 57 (tf). El porcentaje de expresión de cada uno de los marcadores se muestra arriba a la derecha de cada histograma.

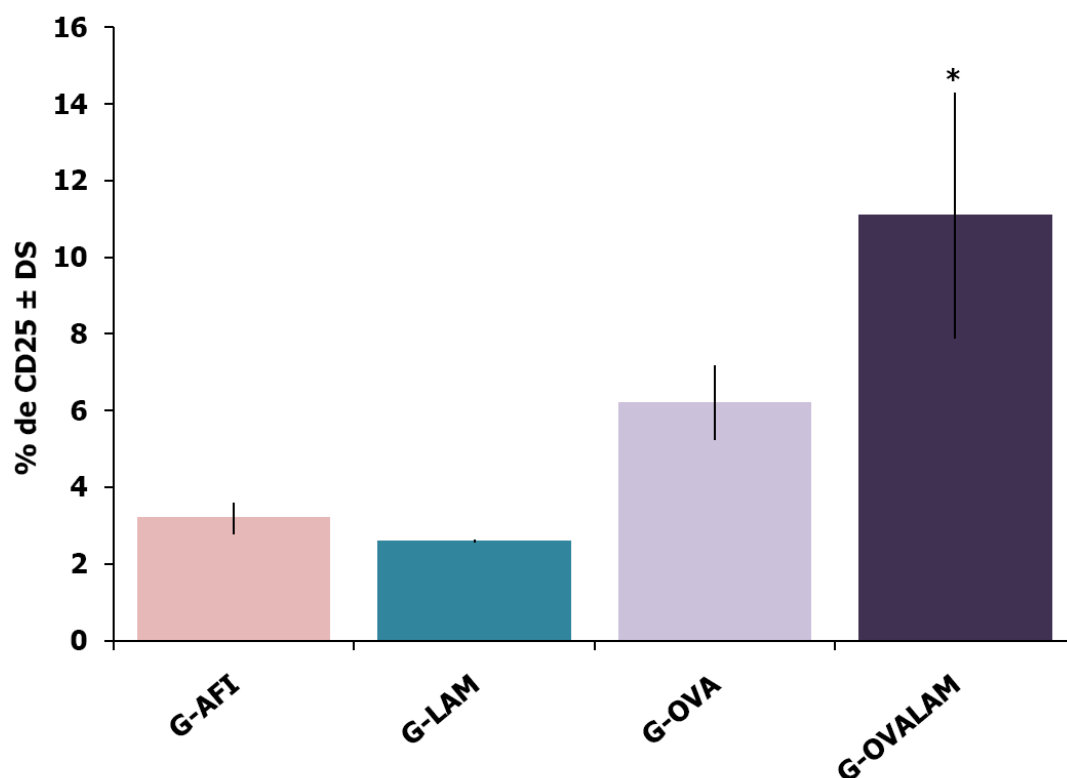
Figura 25: Subpoblaciones linfocitarias periféricas evaluadas a tf de un bovino representativo de cada grupo de tratamiento



CMN periféricas de un bovino representativo del grupo: a) G -AFI, b) G-LAM, c) G-OVA, d) G-OVALAM. M1: corresponde al sector de control negativo (autofluorescencia). M2: corresponde al sector considerado como eventos positivos
 * indica diferencias significativas detectadas por el post-ANOVA (LSD) realizado a tf comparando entre grupos para cada tratamiento. $p < 0,05$.

Los porcentajes de células de las diferentes subpoblaciones obtenidas para los diferentes grupos fueron comparados por ANOVA. Los animales del grupo G-OVA y G-OVALAM mostraron aumento en el porcentaje de células con IgG presente en su superficie, así como también los $CD4^+$ y $CD25^+$. Los animales pertenecientes al grupo G-OVALAM mostraron un aumento ($p=0,01$) en la subpoblación $CD25^+$ a tf (Figura 26). El grupo de animales que recibió LAM (G-LAM) mostró valores similares al grupo que recibió solo AFI (G-AFI), excepto para $CD4$ pues esta población mostró una disminución no significativa en el G-LAM.

Figura 26: Efecto de LAM sobre la subpoblación $CD25^+$ *in vivo*



Los resultados se expresan como porcentaje de células $CD25^+$ marcadas \pm desvío estándar (DS).

* indica diferencias significativas detectadas por el post-ANOVA (LSD) realizado a tf comparando entre grupos. $p < 0,05$.

23.4. Subpoblaciones celulares estimuladas *in vitro*

Con el fin de conocer cuáles eran las subpoblaciones que proliferaban *in vitro* se marcaron las células provenientes de cultivos celulares con los mismos marcadores de superficie utilizados para la evaluación *in vivo*.

Se cultivaron las CMN obtenidas a tiempo final por tres días sin estímulo (proliferación espontánea) o estimuladas con ConA, OVA y LAM para determinar cuáles eran las poblaciones linfocitarias predominantes que respondían *in vitro*.

En la Tabla 15 se muestran los porcentajes de cada una de las subpoblaciones analizadas detectados para cada grupo de animales estudiados *in vivo* e *in vitro*.

Tabla 15: Subpoblaciones linfocitarias.

t0	G-OVALAM				
	<i>In vivo</i>		<i>In vitro</i>		
	tf	Espontáneo	ConA	OVA	LAM
sIgG 12,60±1,58	17,70±3,60	11,60±3,78	19,50±0,54	11,50±2,60	11,00±0,50
CD4⁺ 23,70±13,06	20,30±4,22	17,01±4,06	22,10±3,10	17,50±5,79	17,70±6,08
CD8⁺ 11,30±2,01	10,70±4,92	17,40±7,80	21,60±3,06	16,00±5,73	16,80±7,05
CD25⁺ 2,00±0,90	11,10±3,20	15,10±4,28	27,50±6,01	15,80±6,09	15,60±8,72
t0	G-OVA				
	<i>In vivo</i>		<i>In vitro</i>		
	tf	Espontáneo	ConA	OVA	LAM
sIgG 12,60±1,58	13,10±5,75	15,70±2,33	20,70±2,29	11,10±2,22	17,60±0,90
CD4⁺ 23,70±13,06	19,50±9,23	23,40±0,47	27,50±6,53	19,70±5,33	22,90±1,46
CD8⁺ 11,30±2,01	9,60±1,06	20,10±2,73	25,20±2,87	18,30±6,74	20,90±2,77
CD25⁺ 2,00±0,90	6,20±0,96	20,60±2,58	28,10±7,65	18,70±6,28	21,60±1,10

Los resultados se expresan en porcentajes de células marcadas ± DS.

Tabla 15. Continuación

t0	G-AFI				
	<i>In vivo</i>		<i>In vitro</i>		
	tf	Espontáneo	ConA	OVA	LAM
sIgG 12,60±1,58	9,20±6,51	18,30±2,92	24,70±7,5	18,20±5,88	16,40±4,70
CD4⁺ 23,70±13,06	18,40±0,32	21,60±1,98	32,60±12,29	19,76±8,14	21,80± 1,05
CD8⁺ 11,30±2,01	7,00±2,91	16,80±5,87	30,50±10,33	19,06±1,11	19,00±2,97
CD25⁺ 2,00±0,90	3,20±0,40	16,50±6,22	35,20±17,25	14,91±4,21	15,40± 8,56
t0	G-LAM				
	<i>In vivo</i>		<i>In vitro</i>		
	tf	Espontáneo	ConA	LAM	
sIgG 12,60±1,58	8,10±4,90	16,4±3,01	15,5±1,67	13,9±1,07	
CD4⁺ 23,70±13,06	11,10±5,00	14,9±7,45	21,8±0,24	18,1±1,80	
CD8⁺ 11,30±2,01	9,10±5,20	17,8±3,88	19,1±3,51	16,8±5,54	
CD25⁺ 2,00±0,90	2,60±0,03	16,6±4,38	25,9±5,65	15,5±6,41	

Los resultados se expresan en porcentajes de células marcadas ± DS.

Comparando las subpoblaciones periféricas antes y después del tratamiento observamos que en el grupo G-OVALAM se incrementaron los

porcentajes de células que expresan IgG en membrana (12,60 vs 17,70) y el porcentaje de CD25 (2,00 vs 11,10). Este incremento de CD25 también se observa en el grupo G-OVA aunque con menos intensidad (2,00 vs 6,20). Sin detectarse variaciones en los grupos controles G-AFI y G-LAM.

En todos los grupos el estímulo con ConA indujo un incremento de todas las poblaciones.

Tanto en los grupos inmunizados modulados con LAM como en los no modulados, la proliferación de las subpoblaciones no se vio afectada por el agregado de LAM como estímulo *in vitro*.

La relación CD4/CD8 se considera una constante en la especie bovina es por eso que se calculó a partir de los porcentajes de células marcadas obtenidas a t0 y tf *in vivo*. Los resultados del análisis de la relación CD4/CD8 se muestran en la Tabla 16.

Tabla 16: Relación CD4/CD8 obtenida a t0 y tf

Relación CD4/CD8		
t0	tf	
	G-OVA	G-OVALAM
2,09	2,05	1,89

En los grupos G-OVA y G-OVALAM se observó una relación CD4/CD8 similar a la reportada para bovinos (1,8; Seo et al., 2007).

23.5. Hipersensibilidad cutánea específica

Para determinar si el agregado de LAM a OVA estimulaba reacciones de hipersensibilidad se realizaron pruebas de intradermorreacción con OVA. A fin de determinar si el uso de LAM inducía reacciones cruzadas con el antígeno comercial destinado al diagnóstico de tuberculosis bovina se evaluó inoculando PPDb *in vivo*.

Los resultados se muestran en la Tabla 17.

Tabla 17: Incremento en el grosor de piel 72 h post-inoculación intradérmica

Incremento del pliegue (mm)			
Promedio \pm DS			
Inoculado con:	PBS	OVA	PPDb
G-AFI	0	0	0,45 \pm 0,47
G-OVA	0,33 \pm 0,57	0,50 \pm 0,50	ND*
G-LAM	0	ND*	0,89 \pm 0,75
G-OVALAM	1,00 \pm 0,87	0,33 \pm 0,57	0,49 \pm 0,71
Control positivo inoculado con Maa inactivado	0	ND*	5,50 \pm 0,66

Los resultados se expresan como incremento del pliegue en milímetros \pm desvío estándar (DS). *ND: no determinado. Se consideraron valores positivos a las diferencias encontradas mayores a 3mm.

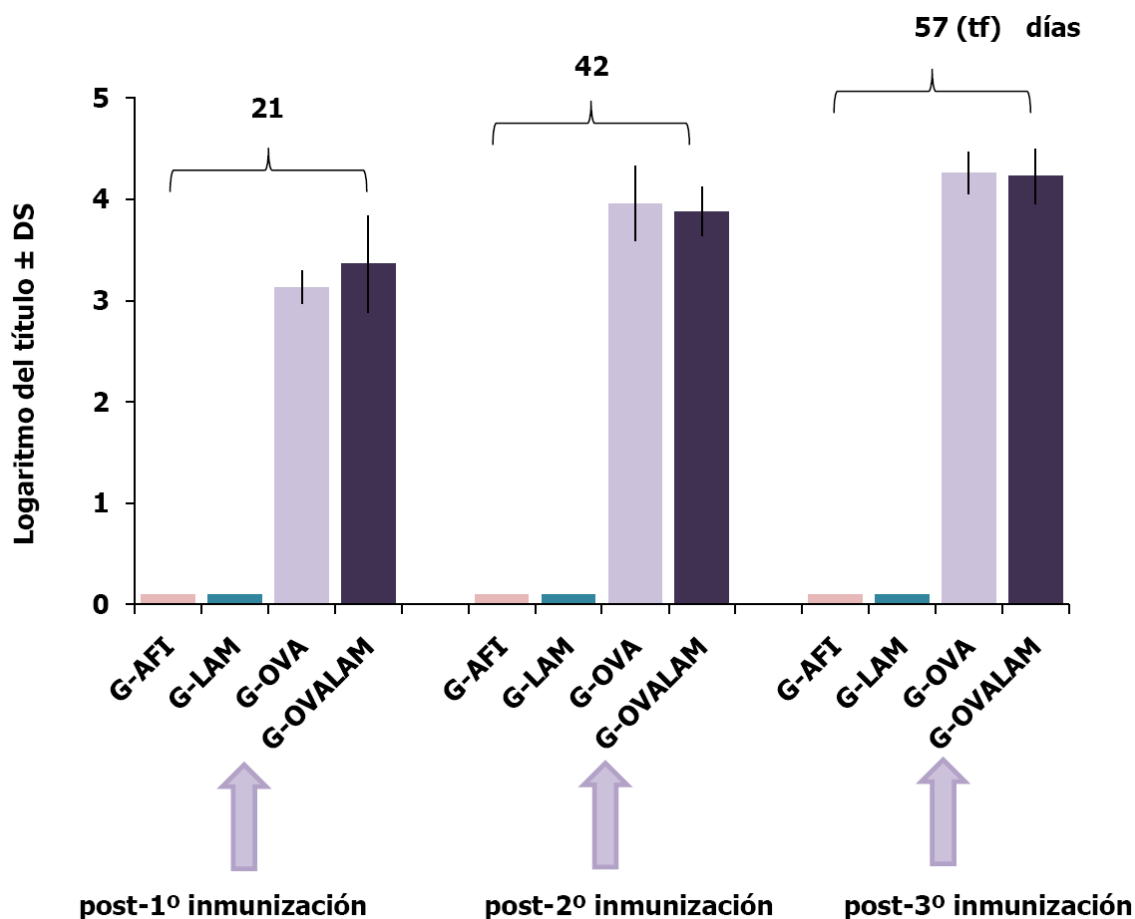
No se detectó aumento en el grosor de la piel luego de 72 h post-inoculación intradérmica en ninguno de los animales utilizados para este experimento. Esto indicaría que el agregado de LAM en la inmunización con OVA (G-OVALAM) no induce hipersensibilidad frente a OVA, así como tampoco frente al antígeno utilizado para el diagnóstico de tuberculosis en bovinos.

24. EVALUACIÓN DE LA INMUNIDAD HUMORAL

24.1. Cinética de anticuerpos específicos frente a OVA

El título de anticuerpos específicos frente a OVA en el suero de los bovinos fue evaluado por la técnica de ELISA a los días 0, 21, 42 y al día 57 (tf). Todos los animales utilizados en los experimentos mostraron títulos menores a 2 antes de la primera inmunización (t0). Los animales del grupo G-AFI resultaron ser negativos (con valores de densidad óptica menores al valor de corte) durante todo el tiempo que se desarrollaron los experimentos. Los resultados obtenidos del ELISA se muestran en la Figura 27.

Figura 27: Cinética de anticuerpos específicos frente a OVA evaluados por ELISA



Los resultados se expresan como logaritmo del título obtenido por ELISA \pm desvío estándar (DS).

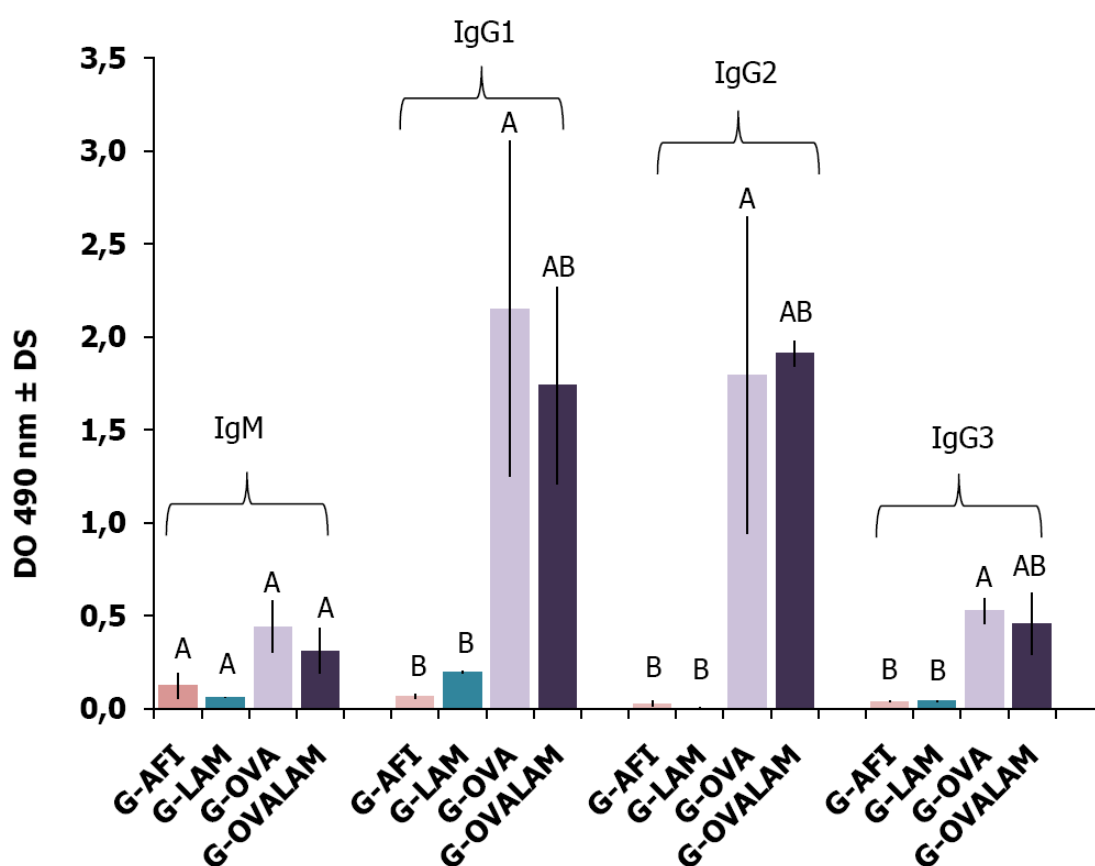
El título de anticuerpos frente a OVA no mostró diferencias significativas entre los grupos inmunizados con OVA tratados o no con LAM (G-OVA y G-OVALAM), en ambos grupos los niveles de anticuerpos detectados fueron mayores a 4 como respuesta a la inmunización. Sin embargo, como respuesta a la primera dosis se observaron mayores títulos en el grupo G-OVALAM.

24.2. Identificación de isotipos específicos frente a OVA

Se evaluaron los diferentes isotipos para determinar cuál o cuáles de los isotipos de Igs podrían verse afectados con el agregado de LAM.

Los resultados obtenidos por ELISA de isotipos se muestran en la Figura 28.

Figura 28: Isotipificación de los anticuerpos específicos frente a OVA



Los resultados se expresan como densidad óptica (DO) a 490 nm ± desvío estándar (DS). Las letras A y B indican las diferencias detectadas por el post-ANOVA (LSD) realizado a t_f comparando entre grupos. $p < 0,05$.

En todos los casos se estudio la presencia de IgA específica frente a OVA en suero, pero no pudo ser detectada por la técnica utilizada en todos los grupos de animales analizados. Se detectaron bajos niveles del isotipo IgM específico sin poder detectarse diferencias significativas entre los diferentes grupos. Para IgG1 e IgG3 se detectó una disminución en la DO obtenida en el grupo G-OVALAM. Mientras que, para el isotipo IgG2 se detectó un leve aumento en la DO en los animales del grupo G-OVALAM comparado con el grupo G-OVA.

Es de destacar las amplias variaciones detectadas entre los animales evaluados que impidieron identificar diferencias significativas.

Se analizó la relación IgG1/IgG2 en los grupos de animales que resultaron positivos a OVA detectándose una disminución en los animales pertenecientes al grupo G-OVALAM (0,9) respecto del grupo G-OVA (1,2).

DISCUSIÓN



25. DISCUSIÓN

Este trabajo de tesis está enmarcado dentro de un proyecto de investigación cuyo principal objetivo es la identificación de la respuesta inmune frente a micobacterias en bovinos. Existen antecedentes que incluyen al LAM como una molécula altamente inmunogénica (Koets et al., 2001; Watanabe et al., 2006) y se la ha relacionado con la patogenicidad de las micobacterias (Chan et al., 1991; Flynn y Chan, 2001; Briken et al., 2004). Estos mecanismos sugirieron su uso como molécula inmunomoduladora (Sayers et al., 2004; Briken et al., 2004; Ito et al., 2008; Guenin-Mace et al., 2009).

Nuestros experimentos estuvieron dirigidos a confirmar este efecto en la modulación de la respuesta inmune de bovinos frente a antígenos T-dependientes.

Este trabajo de tesis nos permitió conocer el efecto del agregado de LAM al adyuvante de Freund incompleto como posible modulador de la respuesta inmune hacia otros antígenos inoculados simultáneamente.

Utilizamos OVA como antígeno T-dependiente basándonos en las publicaciones previas de otros autores que utilizaron este antígeno para evaluar el efecto de otros adyuvantes tanto en ratones como en bovinos (Hernández et al., 2005; Habjanec et al., 2010). En nuestro modelo, OVA se comportó como un típico antígeno T-dependiente ya que la combinación antigénica (OVA+AFI) indujo, sólo con una inmunización, altos títulos de anticuerpos específicos en concordancia con los descritos por Heriazon et al. (2009a) y Habjanec et al. (2010) y el predominio de inmunoglobulinas del isotipo IgG. Asimismo, indujo linfoproliferación siete veces superior al nivel basal evaluado luego de la tercera dosis. Es de destacar que este valor supera los informados por Sun et al. (2002) quienes utilizando OVA junto con

otros adyuvantes, no lograron duplicar el índice de estimulación detectado y Shi et al. (2009), quienes duplicaron ese índice de estimulación, este resultado posiblemente se produzca por las limitaciones de la técnica utilizada por estos autores. Tal como fue descripto por Hernández et al. (2005) y Heriazon et al. (2009a), la inmunización con OVA permitió obtener altos niveles de anticuerpos y de respuesta inmune celular.

El uso del adyuvante oleoso (AFI) en nuestros inóculos se fundamenta en la inclusión de éste en varias formulaciones comerciales, en vacunas destinadas a bovinos (Robiolo et al., 2010) y humanos (Roman et al., 2009); debido a que induce un incremento de la inmunidad humoral (Pérez Filgueira et al., 1999; Batista et al., 2010).

El efecto del uso de los inmunomoduladores debe ser evaluado en la especie de destino ya que, varios investigadores han marcado la diferencia entre la respuesta inmune inducida en los animales de laboratorio (ratones) y los bovinos (Koets et al., 2001; Estes y Brown, 2002; Lee et al.; 2005; Seo et al., 2007).

En este sentido, nuestro trabajo se realizó en condiciones de producción extensiva de bovinos con alimentación a pasturas naturales, agregando además de la especie (a la cual está destinado el inmunomodulador), las condiciones del medio ambiente natural. Una de las características de este modelo es que los resultados muestran grandes variaciones individuales producto de la heterogénea genética autóctona. Consideramos que los resultados obtenidos en este trabajo de tesis son representativos de la población de los animales de la región pampeana. Esto se pudo lograr gracias a la utilización de un antígeno experimental no infeccioso. En contraste, otros investigadores, a pesar de utilizar la especie bovina en sus experimentos de modulación, realizan los trabajos con animales estabulados y con dietas controladas (Pérez Filgueira et al., 1999;

Hernández et al., 2005, Seo et al., 2007; Heriazon et al., 2009a; Heriazon et al., 2009b).

La dosis de OVA, el rango en la dosis de LAM y el plan de inmunización utilizados en nuestros experimentos se basaron en los publicados por Hernández et al. (2005) que habían trabajado en un modelo de modulación en la especie bovina.

Es de destacar, que no hemos hallado en la bibliografía estudios que utilicen LAM de Maa y que, a nuestro entender, este trabajo es el primero que utiliza LAM de Maa como inmunomodulador. A pesar de desconocer la estructura de LAM de Maa, su origen (a partir de una micobacteria patógena) sugiere la presencia de manosa en su cubierta y, por ende, el efecto modulador producido por ManLAM (Briken et al., 2004; Pitarque et al., 2009). Nuestro trabajo confirma este efecto aportando indicios que sostienen esta afirmación.

La metodología desarrollada para la extracción de LAM se basó en lo publicado anteriormente por Hamasur et al. (1999), en *Mycobacterium tuberculosis*. Nuestros resultados fueron similares a los publicados por dichos autores, dado que los rendimientos del extracto crudo y del LAM purificado fueron de 15,7% y 3,5% mientras que, los rendimientos obtenidos en sus experimentos para *Mycobacterium tuberculosis* fueron de 17% y 8,1% respectivamente. Mediante el uso del anticuerpo monoclonal que reconoce específicamente LAM de *Mycobacterium tuberculosis* confirmamos que la estructura del LAM obtenido (a partir de cultivos de *Mycobacterium avium* subsp. *avium*) conserva un alto grado de similitud antigénica con el de *Mycobacterium tuberculosis*, concordando con los resultados obtenidos por Hamasur et al. (1999).

Una de las limitantes más importantes del uso de adyuvantes es el posible efecto tóxico directo o indirecto sobre los productos derivados al consumo humano. En nuestro trabajo se evaluaron una serie de parámetros fisiológicos a fin de controlar la formulación del inmunógeno utilizado. Los valores hematológicos no se vieron afectados por el tratamiento a la dosis y vía utilizados ya que, los rangos detectados se corresponden con los valores normales reportados para la especie bovina (Kraft y Schillinger, 1998; The Veterinary Manual, 2010). Las pequeñas variaciones encontradas en la fórmula leucocitaria podrían estar relacionadas con las modificaciones etarias descritas por Villouto y Rubio en 1978. Sin embargo, la leve disminución detectada en los neutrófilos en los grupos tratados con LAM podría reflejar un efecto inhibitor de esta molécula en la inmunidad innata tal como lo describieron Chan et al. (1989); Chan et al. (1991); Flynn y Chan. (2001), Briken et al. (2004) y Majumder et al. (2008a) en otras especies.

Los perfiles de proteínas séricas no arrojaron diferencias en los animales tratados con LAM, coincidiendo con los valores normales para la especie bovina descritos por Ota Barta (1993); Kraft y Schillinger (1998) y en el The Veterinary Manual (2010).

El aumento de peso en el período de experimentación fue similar en todos los grupos por lo que se puede considerar un factor independiente del tratamiento. Estos resultados no coinciden con otros autores (Worthington y Nosky, 2000), que afirman que, el uso de paredes celulares de micobacterias como inmunoestimulantes, induciría un aumento de peso en bovinos. La posible explicación de este hecho podría ser que las fracciones responsables de este efecto se hubieran perdido durante la purificación de LAM. A pesar de ello, el promedio de ganancia de peso en los animales incluidos en nuestros experimentos (425 g/día) fue mayor que el publicado por Ohanian et al. (2010) quienes informan un aumento de 152 g/día para un rodeo criado a campo.

Dentro de las vacunaciones obligatorias para bovinos en la República Argentina se encuentra la inmunización cada 6 meses con la vacuna anti-aftosa. El título de anticuerpos específicos detectados fue muy bajo posiblemente porque correspondían a la primovacuna. No se detectaron diferencias significativas entre los diferentes grupos de animales, tratados o no con LAM. Otros autores obtienen resultados similares cuando vacunan utilizando paredes celulares de micobacterias como adyuvante en vacunas anti-aftosa (Pérez Filgueira et al., 1999; Batista et al., 2010). En esos experimentos el inmunomodulador fue formulado junto con el antígeno. Sin embargo, en nuestros experimentos el inoculo fue formulado con otro antígeno e inoculado en forma simultánea.

Pocos son los datos sobre el estado sanitario de los rodeos en Argentina relativo a las infecciones causadas por micobacterias, tanto paratuberculosis como tuberculosis (Torres, 2008). Los controles realizados en los bovinos incorporados a nuestros experimentos resultaron negativos indicando la posibilidad de su uso en los experimentos.

El análisis de los parámetros hematológicos y de peso evaluados en nuestros animales indicó que el tratamiento con LAM no indujo alteraciones detectables, esto podría constituir un primer acercamiento a la evaluación de la inocuidad del inmunomodulador.

El efecto de LAM como inmunomodulador fue analizado en la rama de la inmunidad innata y adaptativa. Uno de los mecanismos efectores más importantes en la inmunidad innata es la fagocitosis ejercida por neutrófilos y macrófagos provenientes de la maduración de monocitos periféricos. Dentro de este proceso se describen mecanismos oxígeno dependientes y oxígeno independientes. En los modelos *in vitro*, tanto con macrófagos humanos, murinos y bovinos varios grupos relacionan los componentes de la pared celular de las micobacterias con la inhibición de la producción de

intermediarios reactivos del oxígeno y óxido nítrico (Chan et al., 1989; Chan et al., 1991; Flynn y Chan., 2001; Ferguson et al., 2006; Majumder et al., 2008a). A través de estos mecanismos las micobacterias inhiben la fusión de fagolisosoma a fin de sobrevivir dentro de los macrófagos (Woo y Czuprynski, 2008). En nuestros experimentos de evaluación de los intermediarios reactivos de oxígeno en células de origen periférico hemos detectado una disminución de la producción de los intermediarios reactivos del oxígeno en el grupo G-OVALAM evaluado a los 15 días luego de la tercera inmunización. Nuestros resultados obtenidos en células periféricas de bovino concuerdan con aquellos detectados en modelos murinos de infección con *Mycobacterium tuberculosis in vivo* o *in vitro* (Chan et al., 1989; Chan et al., 1991; Flynn y Chan., 2001). A nuestro entender no existen publicaciones previas donde se hallan realizados experimentos similares en modelos bovinos.

Se ha demostrado que los monocitos y macrófagos bovinos no estimulan la producción de intermediarios reactivos del oxígeno luego de la infección con *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, aunque se desconoce cuál es el mecanismo que utiliza la bacteria para inhibir la producción de dichos componentes (Weiss et al., 2002; Woo y Czuprynski, 2008). Según lo detectado en nuestros experimentos, el LAM de la membrana de las micobacterias podría estar implicado en este mecanismo inhibitorio. Varios autores informan que el LAM de varias micobacterias son reconocidos por receptores de tipo "toll" conocidos como TLR2 e inducen un efecto pro-inflamatorio (Ito et al., 2008; Birch et al., 2010, Bhattacharya et al., 2010). Sin embargo, las moléculas de ManLAM provenientes de micobacterias patógenas serían reconocidas por receptores de manosa y DC-SIGN presentes en las células presentadoras de antígeno, induciendo una respuesta de tipo anti-inflamatoria (Nigou et al., 2001; Geijtenbeek et al., 2003; Ito et al., 2008).

Nuestros resultados aportan datos originales sobre el efecto de la aplicación de LAM de *Mycobacterium avium* subsp. *avium in vivo* en relación a la producción de intermediarios reactivos del oxígeno luego del tratamiento con LAM. Es de destacar que este efecto se observó a los 15 días de la tercer dosis y la evaluación se realizó frente a *Saccharomyces cerevisiae* lo que indica que el efecto observado se mantiene durante el tiempo (por lo menos 15 días) y que afecta la respuesta inmune innata. Podemos confirmar que, el LAM incluido en una formulación vacunal, inhibe un mecanismo de inmunidad innata *in vivo*, lo cual justifica la profundización, a futuro, de los mecanismos moleculares involucrados.

Uno de los pilares de la inmunización activa es la inducción de una respuesta de memoria por estímulo de la respuesta inmune adaptativa.

Nuestro estudio propone el agregado de LAM a la formulación vacunal (proteína + AFI) basado en los resultados obtenidos con adyuvante de Freund completo, pero intentando eliminar la interferencia que este produce con el diagnóstico de enfermedades producidas por micobacterias.

El estímulo de la respuesta celular específica constituye una herramienta para incrementar la protección frente a patógenos intracelulares ya que su eliminación requiere de mecanismos efectores celulares. Nuestro trabajo mostró que el LAM incrementa la respuesta inmune celular específica, evaluada por linfoproliferación, cuando se comparó con la vacunación del antígeno con adyuvante de Freund incompleto. Este efecto también fue detectado en modelos *in vitro* tanto en ratones (Majumder et al., 2008b; Shi et al., 2009) y en cultivo de células humanas (Sieling et al., 2005) estimuladas con *Mycobacterium tuberculosis*, como en cobayos (Watanabe et al., 2006) con LAM de *Mycobacterium tuberculosis*. En un modelo bovino se ha detectado un aumento en la proliferación específica cuando se utilizaban adyuvantes oleosos (ISA50 e ISA70) cuando se los

comparó con el uso de liposomas catiónicos (Vordermeier et al., 2009). Los resultados publicados por estos investigadores son de niveles comparables a los detectados con AFI y LAM. Mientras que Watanabe et al. (2006) que inocularon cobayos con LAM de *Mycobacterium tuberculosis*, también detectaron este efecto. Estos autores teorizan sobre la proliferación de la subpoblación CD1 como posible responsable de la estimulación y presentación antigénica. Aún no se han dilucidado los mecanismos a través de los cuales este efecto se produce en la especie bovina ya que se ha reportado la carencia del receptor CD1d (Van Rhijn et al., 2006).

También mostramos un incremento en la proliferación frente a mitógenos como ConA en el grupo G-OVALAM, lo que indicaría que el estímulo con LAM afecta tanto a linfocitos específicos frente al antígeno como a otras poblaciones. Nuestros valores de proliferación son similares a los publicados por Wu et al. (2009) quienes utilizan esta técnica para el análisis de un modulador en bovinos.

La respuesta de tipo Th1 implica la producción de $\text{IFN}\gamma$ cuyos principales efectos son la activación de macrófagos y linfocitos. Este tipo de perfil se relaciona con una respuesta inmune protectora en infecciones por micobacterias (Hope y Vordemeier, 2005). En nuestros experimentos, hemos detectado un aumento en la producción de $\text{IFN}\gamma$ en sobrenadantes de cultivo de CMN estimuladas *in vitro* con OVA y ConA, en los animales tratados con LAM con niveles de entre 600 y 800 pg/mL.

Las emulsiones agua en aceite (ISA50 e ISA70) como adyuvantes fueron evaluadas como inductores de $\text{IFN}\gamma$ por Vordermeier et al. (2009) obteniendo un incremento significativo comparado con aquellos de tipo liposomas catiónicos (CAF01), sin embargo, la medición de esta molécula fue informada como densidad óptica o unidades formadoras de placas, por lo que nuestros resultados no pueden ser comparados en forma directa.

Varios trabajos realizados en bovinos han relacionado el incremento en la producción de $\text{IFN}\gamma$ con la inducción de un perfil de tipo Th1 como producto de la sensibilización previa *in vivo* con los adyuvantes utilizados (Heriazon et al., 2009b; Vordermeier et al., 2009). Experimentos realizados *in vitro* también han demostrado que la estimulación con *M. bovis* o LAM de *M. bovis* indujo un aumento en la producción de $\text{IFN}\gamma$ (Ito et al., 2008). Rosenkrands et al. (2005), en un modelo murino, también habían detectado un aumento en la producción de $\text{IFN}\gamma$ producto del uso de lípidos de micobacterias como adyuvantes.

El análisis de las subpoblaciones de linfocitos periféricos permite identificar a aquellas células que se ven afectadas por la inmunomodulación. Nuestros experimentos muestran un incremento de las células que expresan CD25 en la superficie. La expresión de este marcador se relaciona con el incremento de subpoblaciones con funciones reguladoras.

A nuestro entender, estos son los primeros resultados que muestran que población se modifica con el agregado de LAM como inmunomodulador.

La relación CD4/CD8, tanto en los bovinos inmunizados con OVA y AFI como en los que además recibieron LAM, se mantuvo en los valores reportados previamente para la especie bovina (Seo et al., 2007). Esto indicaría que al agregado de LAM no modifica la proporción entre estas subpoblaciones.

Poco se sabe acerca de las poblaciones CD25^+ en bovinos, algunos autores sostienen que no cumplirían funciones reguladoras (Hoek et al., 2009). En nuestros experimentos detectamos además, un incremento en la producción de $\text{IFN}\gamma$, citoquina relacionada con el perfil Th1 y la inmunidad celular.

La medición de la hipersensibilidad cutánea producida frente al derivado proteico purificado (PPDb) constituye la determinación más ampliamente utilizada para la detección de tuberculosis en humanos y bovinos. A pesar de ello, la técnica diagnóstica tiene limitaciones ya que el antígeno utilizado posee reacciones cruzadas con otras micobacterias. De esta forma se producen reacciones positivas en casos de exposición a otras micobacterias ambientales que no son patógenas (Waters et al., 2006).

En estudios realizados en bovinos inoculados con paredes celulares de *M. phlei* junto con OVA se demostró una reacción positiva a la prueba específica con OVA (Hernández et al., 2005). Nuestros resultados indican que la modulación por LAM no interfiere con el diagnóstico de tuberculosis *in vivo* ni de paratuberculosis *in vitro* ya que la respuesta específica frente a PPDb no pudo ser detectada en los grupos inoculados con LAM como inmunomodulador. Dado que en nuestro modelo utilizamos LAM purificado, podríamos afirmar que el uso de este inmunomodulador no produce el mismo efecto que las paredes celulares tal como lo describen Hernández et al. (2005); Heriazon et al. (2009b). Estos resultados alientan su posible utilización en la formulación de vacunas para la especie bovina.

La inmunidad humoral está representada principalmente por la producción de inmunoglobulinas específicas. El estudio de las inmunoglobulinas séricas evaluando la concentración relativa y su composición isotópica constituye una herramienta útil para la evaluación de inmunomoduladores.

Nuestros resultados muestran que la modulación por LAM en bovinos indujo anticuerpos específicos de alto título desde la primera inmunización. Estos niveles se incrementaron en la segunda dosis y se mantuvieron luego de la tercera inmunización. Nuestros resultados coinciden con los publicados por Heriazon et al. (2009a) utilizando OVA junto con saponinas (Quil a) a los

14 y a los 28 días post-inmunización, quienes analizaron los valores obtenidos como índice de aumento del título.

Algunos estudios previos informan la influencia de los adyuvantes en la producción de isotipos de inmunoglobulinas (Sun et al., 2004). Se propone la relación entre los isotipos producidos y el perfil de respuesta inmune en bovinos (Estes y Brown, 2002). Nuestros resultados indican que la respuesta sérica frente a OVA predominante es IgG1 e IgG2 y en menor proporción IgG3. La relación entre IgG1/IgG2 es un índice utilizado para determinar el perfil de la respuesta inmune inducida. En nuestros experimentos pudimos detectar una disminución de este índice en los animales inmunizados con LAM (de 1,2 a 0,9). Esto sugiere una tendencia de LAM a inducir una respuesta de tipo Th1.

Hemos incorporado la medición de IgG3 que posee un comportamiento similar a lo detectado para IgG1, a pesar de no poder confirmar la funcionalidad de este isotipo.

La importancia del incremento del isotipo IgG2 se relaciona con la capacidad de este isotipo de favorecer la eliminación de los patógenos a través del mecanismo de fagocitosis, es importante recalcar que el receptor FC γ II es propio de la especie bovina y su función no está aún dilucidada (Kasckovics, 2004).

Dado que en los animales del grupo G-OVALAM se detectó un aumento en la producción de IgG2, y por los resultados obtenidos a nivel de la respuesta inmune celular, el agregado de LAM estaría modulando la respuesta inmune hacia el perfil Th1.

En la especie ovina Rothel et al. (1998) detectan un aumento en el isotipo IgG2 específico y en la producción de IFN γ cuando se utiliza AFI como adyuvante junto con una proteína recombinante de *Taenia ovis*. En nuestros experimentos sólo se detectó un aumento del isotipo IgG2 cuando se agregó

LAM a la preparación. Otros factores como la calidad del antígeno, la dosis, la vía utilizada, el plan de inmunización y por último la especie utilizada pueden estar involucrados en estas diferencias.

Este trabajo no sólo está dirigido a conocer el efecto modulador de LAM, sino que, además, pretende contribuir en el conocimiento de la respuesta inmune en la especie bovina.

Nuestros resultados aportan datos originales sobre la respuesta inmune innata en el bovino, la modulación de la cinética de respuesta inmune humoral, los isotipos involucrados, con mención especial sobre la evaluación del isotipo IgG3, así como también, la modulación de la respuesta linfoproliferativa frente a antígenos T-dependientes.

Los adyuvantes agregados a vacunas pueden jugar un papel significativo en la polarización de la respuesta inmune. Según los resultados obtenidos durante los experimentos realizados en esta tesis podríamos afirmar que el LAM agregado al AFI como inmunomodulador en bovinos induce ambas respuestas inmunes, humoral y celular, así como también cambio en el perfil de respuesta. Restaría determinar otros mecanismos involucrados en esta inmunomodulación.

El uso de LAM de Maa como modulador de la respuesta inmune en bovinos no interfirió en el diagnóstico de tuberculosis *in vivo*. Las pruebas de este modelo en vacunas de uso veterinario utilizadas para la protección frente a enfermedades infecciosas en la especie bovina sería el próximo paso para confirmar si es posible mejorar la sanidad bovina y, en consecuencia, su producción.

CONCLUSIONES



26. CONCLUSIONES

Según la hipótesis y los objetivos planteados respecto de la respuesta inmune se puede concluir que el LAM inoculado como formulación junto con AFI a bovinos vacunados con OVA:

- ✓ Inhibe la producción de intermediarios reactivos del oxígeno en células periféricas adherentes.
- ✓ Induce un aumento en la proliferación *in vitro* de células periféricas tanto estimuladas con mitógenos como antígeno específicos (OVA).
- ✓ Que esta proliferación se ve acompañada de un aumento en la producción de IFN γ .
- ✓ Induce un aumento en la subpoblación linfocitaria periférica CD25⁺.
- ✓ No induce hipersensibilidad cutánea específica frente a PPD_b en los terneros que recibieron LAM por lo tanto no interfiere en el diagnóstico de tuberculosis *in vivo*.
- ✓ No interfiere en el diagnóstico de paratuberculosis *in vitro*.
- ✓ La respuesta inmune humoral específica a OVA se incrementó con la primera dosis manteniéndose en valores altos durante todo el proceso evaluado.

- ✓ Induce la producción de IgM, IgG1, IgG2 e IgG3 en los grupos analizados y disminuye la relación IgG1/IgG2 indicando una modulación hacia el perfil Th1.

BIBLIOGRAFÍA



27. BIBLIOGRAFÍA

- Akira, S. 2003. Toll-like receptor signaling. *J Biol Chem* 278, 38105-08.
- Akira, S.; Hemmi, H. 2003. Recognition of pathogen-associated molecular patterns by TLR family. *Immunol Lett* 85, 85-95.
- Akira, S.; Uematsu, S.; Takeuchi, O. 2006. Pathogen Recognition and Innate Immunity. *Cell* 124, 783–801.
- Bendelac, A.; Rivera, M.N.; Park, S.H.; Roark, J.H. 1997. Mouse CD1-specific NK1 T cells: development, specificity and function. *Annu Rev Immunol* (15), 535–62.
- Barrow, W., Carvalho, de Sousa J.P.; Davis, T.L.; Wright, E.L.; Bachelet, M., Rastogi, N. 1993. Immunomodulation of human peripheral blood mononuclear cell functions by defined lipid fractions of *Mycobacterium avium*. *Infect Immun* 61 (12), 5286-93.
- Batista, A.; Quattrocchi, V.; Olivera, V.; Langellotti, C.; Pappalardo, J.S.; Di Giacomo, S.; Mongini, C.; Portuondo, D.; Zamorano, P. 2010. Adjuvant effect of Cliptox on the protective immune response induced by an inactivated vaccine against foot and mouth disease virus in mice. *Vaccine* 28 (38) 6361-66.
- Besra, G.S.; Brennan, P.J. 1997. Glycoconjugate biosynthesis. *Biochem Soc Trans* 25, 845-90.
- Bhattacharya, P.; Bhattacharjee, S.; Gupta, G.; Majumder, S.; Adhikari, A.; Mukherjee, A.; Majumdar, S.B.; Saha, B.; Majumdar, S. 2010. Arabinosylated lipoarabinomannan-mediated protection in visceral

leishmaniasis through up-regulation of toll-like receptor 2 signaling: an immunoprophylactic approach. *J Infect Dis* 202 (1), 145-55.

Bhattacharjee S.; Majumder N.; Bhattacharyya P.; Bhattacharyya S.; Majumdar S. 2007. Immunomodulatory role of arabinosylated lipoarabinomannan on *Leishmania donovani* infected murine macrophages. *Indian J Biochem Biophys* 44 (5), 366-72.

Birch, H.L.; Alderwick, L.J.; Appelmelk, B.J.; Maaskant, J.; Bhatt, A.; Singh, A.; Nigou, J.; Eggeling, L.; Geurtsen, J.; Besra, G.S. 2010. A truncated lipoglycan from mycobacteria with altered immunological properties. *Proc Natl Acad Sci* 107 (6), 2634-9.

Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitations of microgram of protein utilizing the of protein dye binding. *Anal Biochem* 7 (72), 248-54.

Briken, V.; Porcelli, S.A.; Besra, G.S.; Kremer, L. 2004. Mycobacterial lipoarabinomannan and related lipoglycans: from biogenesis to modulation of the immune response. *Mol Microbiol* 53 (2), 391-403.

Cervenak, J.; Kacskovics, I. 2009. The neonatal Fc receptor plays a crucial role in the metabolism of IgG in livestock animals. *Vet Immunol Immunopathol* 128, 171-77.

Chan, J.; Fujiwara, T.; Brennan, P.J.; McNeil, M.; Turco, S.J.; Sibille, J.C.; Snapper, M.; Aisen, P.; Bloom, B.R. 1989. Microbial glycolipids: a possible virulence factor that scavenge oxygen radicals. *Proc Natl Acad Sci* 86, 2453-57.

Chan, J.; Fan, X.; Hunter, S.W.; Brennan, P.J.; Bloom, B.R. 1991. Lipoarabinomannan: a possible virulence factor involved in persistence

of *Mycobacterium tuberculosis* within macrophages. Infect Immun 59 (5), 1755-61.

Chang, J.C.C.; Diveley, J.P.; Savary, J.R.; Jensen, F.C. 1998. Adjuvant activity of incomplete Freund's adjuvant. Advanced Drug Delivery Reviews 32, 173-86.

Chatterje, D.; Bozic, C.M.; McNeil, M.; Brennan, P.J. 1991. Structural features of the arabinanan component of the lipoarabinomannan of *Mycobacterium tuberculosis*. J Biol Chem 266, 9652-60.

Chatterjee, D.; Khoo, K.; McNeil, M.; Dell, A.; Morris, H. R.; Brennan, P. J. 1993. Structural definition of the non reducing termini of mannose capped LAM from *Mycobacterium tuberculosis* through selective enzymatic degradation and fast atom bombardment-mass spectrometry. Glycobiology 3, 497-506.

Chung W.B.; Bäckström L.R.; McDonald J.; Collins M.T. 1993. The (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) 2,5-diphenyltetrazolium) colorimetric assay for the quantitation of *Actinobacillus pleuropneumoniae* cytotoxin. Can J Vet Res 57, 190-97.

Cobo, E.R.; Morselle, C.; Cano, D.; Cipolla, A.; Campero, C.M. 2004. Immunization in heifers with dual vaccines containing *Trichomonas foetus* and *Campylobacter fetus* antigens using systemic and mucosal routes. Theriogenology 62 (8), 1367-82.

Dec, M.; Wernicki, A. 2006. Conglutinin, CL-43 and CL-46--three bovine collectins. Pol J Vet Sci 9 (4), 265-75.

- Doménech, A.; Gibello, A.; Collado, VM.; Porras, R.; Blanco, M.M. 2008. El Sistema Inmune Innato II: primera respuesta frente a la infección. Revista Complutense de Ciencias Veterinarias 2 (1), 17-30.
- Dubois, M.; Gilles, K.A.; Hamilton, J.K.; Rebers, R.A.; Smith, F. 1956. Colorimetric method for the determination of sugars and related substances. Anal Chem 28, 350.
- Estes, D.M.; Brown, W.C. 2002. Type 1 and type 2 responses in regulation of Ig isotype expression in cattle. Vet Immunol Immunopathol 90, 1-10.
- Fainboim, L.; Geffner, J. 2005. Introducción a la Inmunología humana. Editorial Médica Panamericana. 5ª Ed. 484 pp.
- Ferguson, J.S.; Martin, J.L.; Azad, A.K.; McCarthy, T.R.; Kang, P.B.; Voelker, D.R.; Crouch, E.C.; Schlesinger, L.S. 2006. Surfactant protein D increases fusion of *Mycobacterium tuberculosis* containing phagosomes with lysosomes in human macrophages. Infect Immun 74 (12), 7005-9.
- Flynn, J.L.; Chan, J. 2001. Immunology of tuberculosis. Annu Rev Immunol 19, 93-129.
- Garton, N.J.; Gilleron, M.; Brando, T.; Dan, H.; Giguere, S., Puzo, G.; Prescott, J.F., Sutcliffe, I.C. 2002. A novel lipoarabinomannan from equine pathogen *Rhodococcus equi* Structure and effect on macrophage cytokine production. J Biol Chem 277 (35), 31722-33.
- Geijtenbeek, T.B.; Van Vliet, S.J.; Koppel, E.A.; Sanchez-Hernandez, M.; Vandenbroucke-Grauls, C.M. Appelmelk, B.; Van Kooyk, Y. 2003. Mycobacteria target DC-SIGN to suppress dendritic cell function. J Exp Med 197 (1), 7-17.

- Gibson, K.J.; Gilleron, M.; Constant, P.; Puzo, G.; Nigou J.; Besra, G. S. 2003a. Structural and functional features of *Rhodococcus ruber* lipoarabinomannan. Microbiology 149, 1437-45.
- Gibson, K. J.; Gilleron, M.; Constant, P.; Puzo, G.; Nigou, J.; Besra, G. S. 2003b. Identification of a novel mannose-capped lipoarabinomannan from *Amycolatopsis sulphurea*. Biochem J 372, 821-29.
- Godderis, B. 1998. Immunology of cattle. Handbook of Vertebrate Immunology. Ed. Pastoret, P. P.; Griebel, P.; Bozin, H.; Govoerts, A. San Diego Academic press. 439-84.
- Guenin-Mace, L.; Siméone, R.; Demangel, C. 2009. Lipids of pathogenic Mycobacteria: contributions to virulence and host immune suppression. Transbound Emerg Dis 56 (6-7),255-68.
- Gupta, G.; Surolia, A. 2007. Collectins: sentinels of innate immunity. Bioessays 29 (5), 452-64.
- Guerardel, Y.; Maes, E.; Ellass, E.; Leroy, Y.; Timmerman, P.; Besra, G. S.; et al., 2002. Structural study of lipomannan and lipoarabinomannan from *Mycobacterium chelonae*. Presence of unusual components with alpha 1,3 mannopyranose side chains. J Biol Chem 277, 30635-48.
- Guerardel, Y.; Maes, E.; Briken, V.; Chirat, F.; Leroy, Y.; Loch, C.; Strecker, G.; Kremer, I. 2003. Lipoamannan and lipoarabinomannan from a clinical isolate of *Mycobacterium kansasii*: novel structural features and apoptosis- inducing properties. J Biol Chem 278 (38), 36637-51.
- Habjanec, L.; Halassy, B.; Tomasic, J. 2010. Comparative study of structurally related peptidoglycan monomer and muramyl dipeptide on

humoral IgG immune response to ovalbumin in mouse. *Int Immunopharmacol* 10 (7), 751-59.

Hamasur, B.; Kallenius, G.; Svenson, S.B. 1999. A new rapid and simple method for large-scale purification of mycobacterial lipoarabinomannan. *FEMS. Immunol Med Microbiol* 24, 11-17.

Hauguel, T.M.; Hackett, C.J. 2008. Rationally designed vaccine adjuvants: separating efficacy from toxicity. *Front Biosci* 13, 2806-13.

Hein, W.R.; Mackay, C.R. 1999. Prominence of $\gamma\delta$ T cells in the ruminant immune system. *Immunology Today* 12, 30-4.

Heriazon, A.; Thompson, K.A.; Wilkie, B.N.; Mathes-Sears, W.; Quinton, M.; Mallard, B.A. 2009a. Antibody to ovalbumin and delayed-type hypersensitivity to *Candida albicans* and mycobacteria in lactating Holstein cows using Quil A or Freund's complete adjuvant. *Vet Immunol Immunopathol* 127, 220-227.

Heriazon, A.; Yager, J.A.; Sears, W.; Mallard, B.A. 2009b. Induction of delayed-type hypersensitivity and interferon-gamma to *Candida albicans* and anti-hen-egg-white lysozyme antibody as phenotypic markers of enhanced bovine immune response. *Vet Immunol Immunopathol* 129, 93-100.

Hernández, A.; Yager, J. A.; Wilkie, B. N.; Leslie, K. E.; Mallard, B. A. 2005. Evaluation of bovine cutaneous delayed-type hypersensitivity (DTH) to various test antigens and a mitogen using several adjuvants. *Vet Immunol Immunopathol* 104, 45-48.

Hoek, A.; Rutten, V.P.M. G.; Kool, J.; Arkesteijn, G.J.A.; Bouwstra, R. J.; Van Rhijn, I.; Koets, A.P. 2009. Subpopulations of bovine WC1+ $\delta\gamma$ T cells

rather than CD4⁺CD25^{high}Foxp3⁺ T cells act as immune regulatory cells *ex vivo*. Vet Res 40, 06.

Hope, J.C.; Vordemeier, H.M. 2005. Vaccines for bovine tuberculosis: current views and future prospects. Expert Rev Vaccines 4 (6), 891-903.

Howard, C.J.; Morrison, W.L. 1999. Leukocyte antigens in cattle, sheep and goats. Vet Immunol Immunopathol 27, 1-276.

Hunter, S.W.; Brennan, P.J. 1990. Evidence for the presence of phosphatidylinositol anchor on the lipoarabinomannan and lipomannan of *Mycobacterium tuberculosis*. J Biol Chem 265, 9272-79.

Ito, T.; Hasegawa, A.; Hosokawa, H.; Yamashita, M.; Motohashi, S.; Naka, T.; Okamoto, Y.; Fujita, Y.; Ishii, Y.; Taniguchi, M.; Yano, I.; Nakayama, T. 2008. Human Th1 differentiation induced by lipoarabinomannan/lipomannan from *Mycobacterium bovis* BCG Tokyo-172. Intern Immunol 20 (7), 849-860.

Kacskovics I. 2004 Fc receptors in livestock species. Vet Immunol Immunopathol 102, 351-362.

Kawai, T.; Akira, S. 2009. The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. Intern Immunol 21 (4), 317-37.

Khoo, K.; Dell, A.; Morris, H.R.; Brennan, P.J.; Chatterjee, D. 1995. Inositol phosphate capping of the non-reducing termini of Lipoarabinomannan from rapidly growing strains of *Mycobacterium*. Mapping of the non reducing termini of LAMs. J Biol Chem 270, 12380-89.

Khoo, K.H.; Tang, J.B.; Chatterjee, D. 2001. Variation in mannose-capped terminal arabinan motifs of Lipoarabinomannans from clinical isolates of

Mycobacterium tuberculosis and *Mycobacterium avium* complex. J Biol Chem 276 (6), 3863-71.

Kraft, H.; Schillinger, D. 1998. Método de laboratorio clínico en medicina veterinaria de mamíferos domésticos. Zaragoza, España: Ed. Acribia. 308 pp.

Koets, A.D.P; Rutten, V.P.M.G.; de Boer, M.; Bakker, D.; Valentin-Weigand, P.; van Eden, W. 2001. Differential changes in heat shock protein-, lipoarabinomannan-, and purified derivative-specific immunoglobulin G1 and G2 isotype responses during bovine *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection. Infec Immun 690 (3), 1492-98.

Kwissa, M.; Kasturi, S.P.; Pulendran, B. 2007. The Science of adjuvants. Expert Rev Vaccines 6, 673-84.

Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227, 680-685.

Lee, J.W.; O'Brien, C.N.; Guidry, A.J.; Paape, M.J.; Shafer-Weaver, K.A.; Zhao, X. 2005. Effect of a trivalent vaccine against *Staphylococcus aureus* mastitis lymphocyte subpopulations, antibody production, and neutrophil phagocytosis. Can J Vet Res 69, 11-8.

Majumder N.; Bhattacharjee S.; Bhattacharjaa (Majumdar) S.; Dey R., Pal N.K.; Majumdar S. 2008a. Restoration of impaired free radical generation and proinflammatory cytokines by MCP-1 in mycobacterial pathogenesis. Scand J Immunol 67, 329-39.

Majumder N.; Bhattacharjee S.; Dey R.; Bhattacharyya P.; Majumdar S.; Pal N.K.; Majumdar S. 2008b. Arabinosylated lipoarabinomannan modulates the impaired cell mediated immune response in *Mycobacterium*

tuberculosis H37Rv infected C57BL/6 mice. *Microbes Infect* 10 (4), 349-57.

Makepeace, B.L.; Jensen, S.A.; Laney, S.J.; Nfon, C.K.; Njongmeta, L.M.; Tanya, V.N.; Williams, S.A.; Bianco, A.E.; Trees, A.J. 2009. Immunization with a multivalent, subunit vaccine reduces patent infection in a natural bovine model of *Onchocerciasis* during intense field exposure. *Plos Neglected Tropical Diseases* 3 (11), e544.

McKee, A.; MacLeod, M.K.L.; Kappler, J. W.; Marrack, P. 2010. Immune mechanisms of protection: can adjuvants rise to the challenge? *BMC Biology* 8, 37-46.

Miller, L.H.; Saul, A.; Mahanty, S. 2005. Revisiting Freund's incomplete adjuvant for vaccines in the developing world. *Trends Parasitol* 21 (9), 412-14.

Miossec, P.; Korn, T.; Kuchroo, V. K. 2009. Interleukin-17 and Type 17 Helper T Cells. *N Engl J Med* 361, 888-98.

Mosmann, T.R.; Coffman, R.L. 1989. Th2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to functional properties. *Annu Rev Immunol* 7, 145-73.

Mundo S.L.; Fontanals A.M.; García M.; Durrieu M.; Alvarez E.; Gentilini E.R.; Hajos S.E. 2008 Bovine IgG1 antibodies against *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* protein p34-cx improve association of bacteria and macrophages. *Vet Res* 39 (06).

Nigou, J.; Gilleron, M.; Cahuzae, B.; Bounery, J.D.; Herolds, M.; Thurnher, M.; Puzo, G. 1997. The phosphatidyl- myo- inositol anchor of the Lipoarabinomannans from *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette Guerin. *J Biol Chem* 272 (37), 23094-103.

- Nigou, J.; Zelle-Rieser, C.; Gilleron, M.; Thurnher, M.; Puzo, G. 2001. Mannosylated lipoarabinomannans inhibit IL-12 production by human dendritic cells: evidence for a negative signal delivered through the mannose receptor. *J Immunol* 166 (12), 7477-85.
- Nigou, J.; Gilleron, M.; Puzo, G. 2003. Lipoarabinomannans: from structure to biosynthesis. *Biochimie* 85,153-166.
- Ohanian A.; González S.; Degea G. 2010. Producción de carne ovina y bovina en dos métodos de pastoreo, en el sur de la provincia de Córdoba, Argentina.
http://www.produccionanimal.com.ar/produccion_y_manejo_pasturas/pastoreo%20sistemas/00.pastoreo%20sistemas.htm. pp.1-3.
- OIE Manual. Paratuberculosis (Johne's disease) Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres. 1996 cap. 3.1.6. 218-28.
- Ota Barta. 1993. Monographs in Animal Immunology, Veterinary Clinical Immunology Laboratory. Vol. 2. Ed. Ota Barta. Bar-Lab. Inc.
- Pérez-Filgueira D.M.; Wigdorovitz A.; Zamorano P.; Ostermann W.; Fernández, F.; Romera A.; Borca M.; Sadir A. 1999. Effect of *Mycobacterium* sp. wall and avridine on the antibody response, IgG isotype profile and proliferative response induced by foot and mouth disease virus (FDMV) vaccination in cattle. *Vaccine* 17, 345-52.
- Pitarque, S., Larrouy-Maumus, G.; Payré, B.; Jackson, M., Puzo, G.; Nigou, J. 2008. The immunomodulatory lipoglycans, Lipoarabinomannan and lipomannan, are exposed at the mycobacterial cell surface. *Tuberculosis* 88, 560-65.

- Quiesnaux, V.J.; Nicolle, D.M.; Torres, D.; Kremer, L.; Guerardel, Y.; Nigou, J.; et al., 2004. Toll-like receptor 2 (TLR2)-dependent positive and TLR2-independent negative regulation of proinflammatory cytokines by mycobacterial lipomannans. *J Immunol* 172, 4425-34.
- Racila, D. M.; Kline, J. N. 2005. Perspectives in asthma: molecular use of microbial products in asthma prevention and treatment. *J allergy Clin Immunol* 116 (6), 1202-05.
- Reed, S.G.; Bertholet, S.; Coler, R.N.; Friede, M. 2009. New horizons in adjuvants for vaccine development. *Trends Immunol* 1, 23-32.
- Riccio, M.B.; Achilles, M.E.; Cano, D.; Lázaro, L.; Cano, A.; Campero, C.M. 2008. Respuesta inmune humoral en vaquillonas vacunadas contra *Trichomonas foetus* y desafiadas con toros infectados. *Rev vet* 19 (2), 101-8.
- Rivas, B.; Santiago, M.; Sada, E.; Hernández-Pando, R.; Tsutsumi, V. 2006. Péptidos antimicrobianos en la inmunidad innata de enfermedades infecciosas. *Salud pública Mex* 48 (1), 62-71.
- Robiolo, B.; La Torre, J.; Maradei, E.; Beascochea, C.P.; Perez, A.; Seki, C.; Smitsaard, E.; Fondevila, N.; Palma, E.; Goris, N.; De Clercq, K.; Mattion, N. 2010. Confidence in indirect assessment of foot-and-mouth disease vaccine potency and vaccine matching carried out by liquid phase ELISA and virus neutralization tests. *Vaccine* 28 (38), 6234-41.
- Roman, F.; Vaman, T.; Gerlach, B.; Markendorf, A.; Gillard, P.; Devaster, J.M. 2009. Immunogenicity and safety in adults of one dose of influenza A H1N1V 2009 vaccine formulated with and without AS03A-adjuvant: preliminary report of an observer-blind, randomised trial. *Vaccine* 28 (7), 1740-5.

- Rosenkrands, I.; Agger, E.M.; Olsen, A.W.; Korsholm, K.S.; Swetman Andersen, C.; Jensen, K.T.; Andersen, P. 2005. Cationic liposomes containing mycobacterial lipids: a new powerful Th1 adjuvant system. *Infect Immun* 73 (9), 5817-5826.
- Rothel, J.S.; Corner, L.A.; Lightowlers, M.W.; Seow, H.F.; Mc Waters, P.; Entrican, G.; Wood, P.R. 1998. Antibody and cytokine responses in efferent lymph node following vaccination with different adjuvants. *Vet Immunol Immunopathol* 63. (1-2), 167-183.
- Sayers, I.; Severn, W.; Scanga, C., Hudson, J.; Le Gros, G.; Harper, J.L. 2004. Suppression of allergic airway disease using mycobacterial lipoglycans. *J Allergy Clin Immunol* 114 (2), 302-09.
- Seo, K.S.; Lee, U.L.; Park, Y.H.; Davis, W.C.; Fox, L.K.; Bohach, G.A. 2007. Long-term staphylococcal enterotoxin C1 exposure induces soluble factor-mediated immunosuppression by bovine CD4⁺ and CD8⁺ T cells. *Infect Immun* 75 (1), 260-9.
- Shi, C.H.; Zhang, T.F.; Zhu, D.S.; Zhang, H.; Bai, B.; Zhao, Y.; Yue, C.L.; Zhao, L.; Liu, J.L. 2009. The immunological responses induced by *Mycobacterium tuberculosis* heat shock protein 16.3 and its synthetic peptide in mice. *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi* 32 (8), 603-7.
- Sieling, P.A.; Torrelles, J.B., Stenger, S.; Chung, W., Burdick, A.E.; Rea, T.H.; Brennan, P.J.; Belisle, J.T.; Porcelli, S.A.; Modlin, R.L. 2005. The human CD1-restricted T cell repertoire is limited to cross-reactive antigens: implications for host responses against immunologically related pathogens. *J Immunol* 174 (5), 2637-44.
- Smit, J.J.; Van Loveren, H.; Hoekstrat, M.O.; Schijf, M.A.; Folkerts, G.; Nijkamp, F.P. 2003. *Mycobacterium vaccae* administration during

allergen sensitization or challenge suppresses asthmatic features. Clin Exp Allergy 33, 1083-89.

Stills, H.F. jr; Stills, H.F. 2005. Adjuvants and antibody production: Dispelling the myths associated with Freund's complete and other adjuvants. ILAR journal 46 (3), 280-93.

Sun, H.X.; Ye, Y.P.; Pan, H.J. 2004. Adjuvant effect of *Panax notoginseng* saponins on the immune responses to ovalbumin in mice. Vaccine 22 (29/30), 3882-88.

Sutcliffe, I.C. 1995. Identification of a lipoarabinomannan like lipoglycan in *Corynebacterium matruchotii*. Arch Oral Biol 40, 1119-24.

Tan, L.; Grewal, P.S. 2002. Comparison of two silver staining techniques for detecting lipopolysaccharides in polyacrylamide gels. J Clin Microbiol 40 (11), 4372-74.

The Veterinary Manual. 2010.

<http://www.merckvetemmanual.com/mvm/htm/bc/tref6.htm>.

Tizard, I., 2009. Inmunología Veterinaria. Editorial Harcourt. Grace de España S A. 8ª ed. 592 pp.

Torres, P.M. 2008. Situación de la tuberculosis bovina en la República Argentina. http://www.senasa.gov.ar/Archivos/File/File1013-situacion_tuberculosis_31_12_09.pdf. 28 pp.

Van Rhijn, I.; Koets, A.P.; Im, J.S.; Piebes, D.; Reddington, F.; Besra, G.S.; Porcelli, S.A.; van Eden, W.; Rutten, V.P. 2006. The bovine CD1 family contains group 1 CD1 proteins, but no functional CD1d. J Immunol 176 (8), 4888-93.

- Villouto, G.; Rubio, T. 1978. Valores hematológicos en terneros Holstein-Friesian de 3 a 180 días de edad. Arch Med Vet 10 (1), 22-26.
- Vordermeier, H.M.; Dean, G.S.; Rosenkrands, I.; Agger, E.M.; Andersen, P.; Kaveh, D.A.; Hewinson, R.G.; Hogarth, P.J. 2009. Adjuvants induce distinct immunological phenotypes in a bovine tuberculosis vaccine model. Clin Vaccine Immunol 16 (10), 1443-48.
- Watanabe, Y., Watari, E.; Matsunaga, I.; Hiromatsu, K.; Dascher, C.C.; Kawashima, T.; Norose, Y.; Shimizu, K.; Takahashi, H.; Yano, I.; Sugita, M. 2006. BCG vaccine elicits both T- cell mediated and humoral immune responses directed against mycobacterial lipid components. Vaccine 24, 5700-07.
- Waters, W.R.; Palmer, M.V.; Thacker, T.C.; Payeur, J.B.; Harris, N.B.; Minion, F.C.; Greenwald, R.; Esfandiari, J.; Andersen, P.; McNair, J.; Pollock, J.M.; Lyaschenko, K.P. 2006. Immune responses to defined antigens of *Mycobacterium bovis* in cattle experimentally infected with *Mycobacterium kansasii*. Clin Vaccine Immunol 13 (6), 611-619.
- Weiss, D.J.; Evanson, O.A.; Moritz, A.; Qi Deng, M.; Abrahamsen, M.S. 2002. Differential Responses of Bovine Macrophages to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and *Mycobacterium avium* subsp. *avium*. Infect Immun 70 (10), 5556–61.
- Woo S.R.; Czuprynski C. 2008. Tactics of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* for intracellular survival in mononuclear phagocytes. J Vet Sci 9 (1), 1-8.
- Worthington, T.; Nosky, B. 2000. Evaluation of the ability of an immune stimulant to alter blood leukocyte populations in newborn calves. <http://www.immunoboost.info/html/full-leukocytes.htm>.

- Wu, H.; Nardone, A.; Lacetera, N. 2009. Effects of a standardized purification dry extract from *Echinacea angustifolia* on proliferation and interferon gamma secretion of peripheral blood mononuclear cells in dairy heifers. *Res Vet Sci* 87 (83), 396-98.
- Zhao, Y.; Jackson, S.M.; Aitken, R. 2006. The bovine antibody repertoire. *Developmental and Comparative Immunology* 30, 175–86.
- Zheng, W.; Flavell, R. A. 1997. The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell* 89, 587-96.
- Zuany-Amorin, C.; Sawicka, E.; Manhus, C., Le Moine, A.; Brunet, L. R.; Kenenly, D.M.; et al., 2002. Suppression of airway eosinophilia by killed *Mycobacterium vaccae*-induced allergen-specific regulatory T- cells. *Nat Med* 2 (8), 625-29.